# Angeborene und erworbene Stoffwechselstörungen in arteriellen glatten Muskelzellen und Fibroblasten bei Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämien

-Zellkulturuntersuchungen zu Faktoren der Arteriosklerose entwicklung-

Dr. Theodor Koschinsky

1982

Diss
Düsseldorf

Aus der Klinischen Abteilung des Diabetes-Forschungsinstitutes
an der Universität Düsseldorf (Direktor Prof. Dr. F.A. Gries)

# Angeborene und erworbene Stoffwechselstörungen in arteriellen glatten Muskelzellen und Fibroblasten bei Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämien

## -Zellkulturuntersuchungen zu Faktoren der Arteriosklerose entwicklung-

Habilitationsschrift der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf zur Erlangung der venia legendi

vorgelegt von

Dr. Theodor Koschinsky

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538105_0003

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | Einleitung und Fragestellung | 1 |
| 2. | Methodik | 9 |
| 2.1. | Material | 9 |
| 2.2. | Serumarten | 10 |
| 2.3. | Präparation der Lipoproteine | 17 |
| 2.4. | Zellinien | 18 |
| 2.5. | Messung des Zellwachstums | 28 |
| 2.6. | Messung von Lipoprotein-Bindung, -Aufnahme und -Abbau | 29 |
| 2.7. | Messung der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasenaktivität | 32 |
| 3. | Ergebnisse | 36 |
| 3.1. | Zellulär fixierte Eigenschaften gezüchteter mesenchymaler Zellen | 36 |
| 3.1.1. | Wachstum von Fibroblasten | 36 |
| 3.1.1.1. | Patienten mit primärem und sekundärem Diabetes mellitus | 36 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 3.1.1.2. | Patienten mit primärer Hyperlipoproteinämie | 45 |
| 3.1.2. | Lipoproteinrezeptoren in Fibroblasten von Patienten mit primärem Diabetes mellitus, mit homozygot familiärer Hypercholesterinämie und von Stoffwechselgesunden sowie in arteriellen glatten Muskelzellen von Stoffwechselgesunden und vom Schwein | 53 |
| 3.1.3. | Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidase in Fibroblasten von Stoffwechselgesunden, Diabetikern und Patienten mit primären Hyperlipoproteinämien sowie in arteriellen glatten Muskelzellen von Stoffwechselgesunden | 65 |
| 3.2. | Effekte des Serums auf den Stoffwechsel von gezüchteten menschlichen Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen | 72 |
| 3.2.1. | Serum von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung | 72 |
| 3.2.1.1. | Wachstum | 72 |
| 3.2.1.2. | Proteinsynthese | 78 |
| 3.2.1.3. | LDL- und HDL-Stoffwechsel | 84 |
| 3.2.1.4. | Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidase | 91 |
| 3.2.2. | Serum von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung | 100 |
| 3.2.2.1. | Wachstum | 100 |
| 3.2.2.2. | Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidase | 104 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 3.2.3. | Serum von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie | 106 |
| 3.2.3.1. | Wachstum | 106 |
| 3.2.3.2. | Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidase | 109 |
| 3.3. | Eigenschaften von Wachstumsfaktoren aus Serum von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung | 117 |
| 4. | Diskussion | 125 |
| 4.1. | Änderungen des Wachstums mesenchymaler Zellen | 125 |
| 4.2. | Änderungen der Proteinsynthese mesenchymaler Zellen | 144 |
| 4.3. | Änderungen des Lipoproteinstoffwechsels mesenchymaler Zellen | 146 |
| 4.4. | Änderungen von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidase in mesenchymalen Zellen | 149 |
| 5. | Zusammenfassung | 157 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 168 |
| 7. | Schlußwort | 220 |

## 1. Einleitung und Fragestellung

Die Lebenserwartung vieler Diabetiker und Hyperlipämiker in den hochindustrialisierten Ländern Europas und Nordamerikas ist bis um 1/3 gegenüber Stoffwechselgesunden verkürzt und wird derzeit vor allem durch angiopathische Komplikationen bestimmt, die auch die Lebensqualität der Betroffenen wesentlich beeinträchtigen (83, 105, 290)

Die Ursachen des mit dem Diabetes mellitus und den Hyperlipoproteinämien verbundenen erhöhten Risikos degenerativer Gefäßerkrankungen, besonders der Arteriosklerose mit ihren vielfältigen klinischen Erscheinungsformen, sind noch immer nur unvollkommen bekannt. Eine detaillierte Kenntnis dieser Stoffwechselkrankheiten und ihrer angiopathischen Komplikationen könnte aber eine differenziertere Therapie sowie erfolgreichere Prävention ermöglichen (105, 114).

Die Entwicklung von arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen kann wesentlich durch Störungen des Kohlenhydrat- und Lipoproteinstoffwechsels beeinflußt werden. Deren Kombination ist von großer klinischer Relevanz und potenziert das Risiko für arteriosklerotische Gefäßerkrankungen(105,107,266)

Zur Klärung der Ursachen für Prädisposition und Entwicklung der Arteriosklerose bei Diabetes mellitus wie familiären Hyperlipoproteinämien sind in den letzten Jahren zunehmend auch Untersuchungen an kultivierten Gefäßwandzellen von Patienten mit familiärer Diabetes- oder Hyperlipoproteinämiebelastung durchgeführt worden. Dabei haben sich u.a. 3 Schwerpunkte herauskristallisiert:

a) Zellassoziierte Änderungen vaskulärer bzw. mesenchymaler Zellen, die in der Zellkultur persistieren, mit Änderungen des Zellstoffwechsels einhergehen und im Zusammenhang mit angiopathischen Veränderungen in vivo gebracht werden können,

b) qualitative und quantitative Veränderungen von im Blut enthaltenen Molekülen, die das angiopathische Risiko wesentlich zu beeinflussen vermögen und
c) angiopathische Auswirkungen der Interaktion der unter a) und b) genannten Zellen und Blutbestandteile.

Für die Pathogenese der Angiopathien beim Diabetes mellitus und den Hyperlipoproteinämien können Änderungen
1) des Wachstums,
2) des Protein- und
3) des Lipoproteinstoffwechsels von mesenchymalen Zellen der Arterienwand von großer Bedeutung sein.

zu 1) Bedeutung von Wachstumsänderungen

Das Wachstum mesenchymaler Zellen aus normalen menschlichen Geweben verläuft in der Zellkultur in charakteristischer Weise. Es ist mit einer begrenzten Teilungsfähigkeit verknüpft, die z.B. für Fibroblasten auf durchschnittlich 50 Verdopplungen der Zellzahl eines Zellstammes beschränkt ist ( 121 ). Dabei ist für die begrenzte Teilungsfähigkeit dieser Zellen nur das sog. physiologische Alter des Spenders, dagegen nicht das chronologische Alter der Zelle von Bedeutung, das z.B. durch Aufbewahrung bei -196°C oder Kultivierung bei 20°C ohne Änderung der möglichen Zellverdopplungen verzögert werden kann. Damit im Einklang steht auch die Beobachtung, daß bei seltenen, familiär gehäuft auftretenden Krankheiten, wie z.B. dem Hutchinson-Gilford- oder dem Werner-Syndrom, die als Modell für vorzeitiges, beschleunigtes Altern angesehen werden, die Zahl der Zellverdopplungen auf 2-10 reduziert ist ( 89, 173 ), während bei Zellen von altersgleichen Gesunden noch 20-40 Verdopplungen möglich sind.

Auch der Diabetes mellitus des Menschen ist im Zusammenhang mit beschleunigtem Altern gebracht worden (97,102). Es wurde sogar eine genetische Prädisposition zu verändertem Wachstumsverhalten von mesenchymalen Diabetikerzellen postuliert ( 99,101 ). Diese an einer relativ kleinen Diabetikerpopulation gewonnenen Ergebnisse sind durch Untersuchungen an anderen Diabetikerkollektiven in Frage gestellt worden(131,225), und es ist bisher nicht geklärt worden, ob eine beschleunigte Zellalterung ein generelles Prinzip beim Diabetes darstellt.
Die Wachstumseigenschaften mesenchymaler Zellen von Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien sind bisher in der Literatur nicht charakterisiert worden.

Das Wachstum mesenchymaler Zellen ist aber nicht nur abhängig von zellulär fixierten sondern auch von humoralen Faktoren. Erst deren Interaktion und kombinierte Wirkung charakterisiert den Ablauf des zellulären Wachstumsprozesses. Die humorale Grundlage des Zellwachstums bilden die nutritiven Substanzen mit essentiellen und nicht-essentiellen Bestandteilen, wie z.B. Aminosäuren, Fettsäuren, Glukose, Vitaminen, Spurenelementen und Elektrolyten. Für ein geregeltes Wachstum sind zusätzliche wachstumsregulierende Substanzen unabdingbar, wie wachstumsfördernde Hormone (z.B. Insulin, Wachstumshormon, Somatomedine) oder Peptide (z.B. Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten, Fibroblasten- und epidermaler Wachstumsfaktor). Die Zahl, Struktur und der Wirkungsmechanismus dieser das Wachstum mesenchymaler Zellen regulierenden humoralen Faktoren ist nur unvollständig bekannt und ist ein Schwerpunkt gegenwärtiger zellbiologischer Forschung(49,55,78,87,90,202,203,232,297).

Bei in-vitro-Untersuchungen mesenchymaler Zellen vom Menschen muß ein zusätzlicher Faktor berücksichtigt werden, der Wachstum und Stoffwechsel dieser Zellen unterschiedlich

beeinflußen kann:
Die Verwendung von heterologen. Seren bzw. Serumbestandteilen . Viele Gewebe bzw. Zellen verschiedener Spezies werden meist aus Gründen der Praktikabilität und besseren Verfügbarkeit mit foetalem Kälberserum gezüchtet. Untersuchungen an Zellen verschiedener Spezies, einschließlich des Menschen, haben aber bei Verwendung homologer Systeme (Zellen und Serum der gleichen Spezies) wesentliche Veränderungen der o.g. Parameter nachgewiesen ( 52, 63 ). Um Rückschlüsse auf den Zellstoffwechsel beim Menschen in vivo ziehen zu können, sollten daher bei in vitro-Untersuchungen nur mesenchymale Zellen (arterielle glatte Muskelzellen und Fibroblasten) von Menschen und menschliche Seren verwendet werden.

Bisher war bekannt, daß Seren von insulinpflichtigen Typ I-Diabetikern wie von verschiedenen Tierspezies mit experimentell induziertem Insulinmangeldiabetes und hypercholesterinämischen Seren verschiedener Spezies das Wachstum von Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen von Menschen, Affen, Kaninchen, Ratten und Schweinen deutlich stärker als Normalseren von Stoffwechselgesunden stimulieren ( 71,159 ). In Seren von ausgewählten insulinpflichtigen, jugendlichen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung wurde als ein wesentlicher Teilfaktor für das vermehrte Wachstum ein erhöhter Wachstumshormonspiegel nachgewiesen (157,158 ). Insulin war in diesen Seren kein wachstumsrelevanter Faktor ( 157 ).

Dagegen sind Seren von nicht-insulinbedürftigen Typ II-Diabetikern mit schlechter wie mit optimaler Stoffwechseleinstellung in ihren Wirkungen auf mesenchymale Zellen bisher nicht systematisch untersucht worden, obwohl Patienten mit Typ II-Diabetes 85-90 % der gesamten Diabetikerpopulation stellen.

zu 2) Bedeutung von Änderungen des Proteinstoffwechsels
Mit dem Zellwachstum ist der Proteinstoffwechsel eng verknüpft. Veränderungen im Proteinstoffwechsel beeinflussen aber nicht nur das Wachstum, die Struktur und den geregelten intrazellulären Funktionsablauf mesenchymaler Zellen, sondern auch extrazelluläre Vorgänge, z.B. durch die extrazelluläre Ablagerung von Proteinen. Der intrazelluläre Proteinstoffwechsel kann dabei prinzipiell im Bereich der Synthese, des Transportes zwischen den Zellkompartimenten und des Abbaus durch lysosomale wie extralysosomale Proteasen verändert sein.

Bei Stoffwechselerkrankungen wie dem Diabetes mellitus oder den Hyperlipoproteinämien sind vereinzelt neben zellulär fixierten Veränderungen auch humoral bedingte Störungen des Proteinstoffwechsels bekannt geworden, z.B. die Synthese bzw. extrazelluläre Abgabe abnormaler Glykoproteine bzw. Kollagenmoleküle durch Diabetikerfibroblasten oder Veränderungen lysosomaler Proteasenaktivitäten in der arteriosklerotischen Gefäßwand der diabetischen Ratte (60,113,295). Beim Diabetes mellitus wurden auch erhöhte Blutspiegel von Inhibitoren zellulärer neutraler Proteasen, wie Alpha-2-Makroglobulin bzw. Alpha-1-Antitrypsin, als ein kausaler Faktor für den verminderten Abbau vaskulärer Bindegewebsproteine angesehen und in Zusammenhang mit der Pathogenese diabetischer Angiopathien gebracht (36).

Systematische Untersuchungen an mesenchymalen Zellen von Diabetikern und Hyperlipämikern über Zusammenhänge zwischen Änderungen des Wachstums und des Proteinstoffwechsels sowie zur Aktivität lysosomaler und extralysosomaler Proteasen und deren Beeinflussung durch humorale stoffwechselabhängige Faktoren sind beim Diabetes bzw. der primären Hypercholesterinämie dagegen bisher nicht vorgelegt worden.

zu 3) Bedeutung von Änderungen des Lipoproteinstoffwechsels
Unter physiologischen Bedingungen wird der Bedarf mesenchymaler Zellen an Lipiden, die für ihre Struktur und/oder ihren Stoffwechsel wichtig sind, wie z.B. Cholesterin oder Phospholipide, überwiegend durch exogene Zufuhr über verschiedene Lipoproteine gedeckt (3,17,24,33,50,92,108,152,153,183,216,260-262). Lipoproteine sind auch am Abtransport des freien Cholesterins, das mesenchymale Zellen nicht selbst abbauen können, beteiligt (57). Zwischen dem Stoffwechsel der Lipoproteine und dem der intrazellulären Lipide bestehen wechselseitige, regulatorische Beziehungen (10,28,29,64,205,218,255,288). Bei deren Störung kann es zu vermehrter intra- und extrazellulärer Akkumulation von Cholesterinestern und Lipoproteinbestandteilen sowie vermehrter Zelldegeneration kommen (15,16,72,73,88,109, 151,258). In der arteriellen Gefäßwand ist dieser Prozeß ein wichtiger Faktor der Atherogenese (20,93,94). In den vergangenen Jahren hat sich daher das Interesse u.a. auch darauf konzentriert, welche zellulären und humoralen Faktoren an der Regulation des Lipoproteinstoffwechsels in mesenchymalen Zellen sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei Störungen des Lipoproteinstoffwechsels, z.B. bei den verschiedenen Formen der Hyperlipoproteinämien oder des Diabetes mellitus beteiligt sind (1,7,8,17,18,19,32,35,40-46,65-67,75, 79,95,96,104,110,114,118,133,140,161,184,187,196,199-201,242, 256,264,265,292).

Eine zentrale Rolle bei der Regulation des Lipoproteinstoffwechsels fällt dabei den Lipoproteinrezeptoren zu (29,37,90, 91,93, 176, 180, 244, 252, 276, 280, 289). So liegt in mesenchymalen Zellen von homozygoten Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie am spezifischen Rezeptor für LDL ein genetisch bedingter Strukturdefekt vor, der zu einer gestörten Regulation des Lipoproteinstoffwechsels führt (30,31, 117). Dagegen sind genetisch bedingte Lipoproteinrezeptorendefekte in mesenchymalen Zellen beim Diabetes mellitus bisher nicht bekannt geworden.

Da in vivo verschiedene Lipoproteine gleichzeitig extrazellulär angeboten und mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität an die Zelloberfläche mesenchymaler Zellen gebunden werden, muß auch die gegenseitige Beeinflussung der Lipoproteinbindung und des nachfolgenden Stoffwechsels, z.B. von LDL und HDL, in Abhängigkeit von der jeweiligen Lipoproteinkonzentration und humoralen Einflüssen berücksichtigt werden (38,181).Die Relevanz solcher Untersuchungen wird durch die Erhöhung des atherogenen Risikos bei Steigerung des LDL/HDL-Verhältnisses im Blut unterstrichen,die in vielen epidemiologischen Studien dokumentiert ist (117).

In mesenchymalen Zellen können aber Störungen des Lipoproteinstoffwechsels auch durch verschiedene genetisch bedingte Mängel an lysosomalen cholesterinesterspaltenden Enzymen hervorgerufen werden, wie z.B. bei der I-Zellerkrankung, der Pseudo-Hurler-Dystrophie, der Wolman'schen Krankheit und der Cholesterinesterspeicherkrankheit (213,248,296 ). Allen diesen Erkrankungen ist gemeinsam eine intrazelluläre Akkumulation von Cholesterinestern unterschiedlichen Ausmaßes mit einer frühzeitigen Entwicklung der Arteriosklerose.

Beim menschlichen wie beim experimentell induzierten Diabetes mellitus sind in Abhängigkeit von der Stoffwechseleinstellung Verminderungen der Aktivität lysosomaler Enzyme, z.B. der Cholesterinesterase, der N-Acetyl-ß-Glukosaminidase oder der Alpha-B-Glukosidase in mononukleären Blutzellen und in Nieren- und Aortenwandgeweben beschrieben worden (125,137,295 ). Ebenso war der LDL-Stoffwechsel in den mononukleären Zellen vermindert und ließ sich durch Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage wieder normalisieren, wobei der Wirkungsmechanismus aber ungeklärt blieb ( 126 ).

Untersuchungen zur Aktivität der lysosomalen Proteasen in mesenchymalen Zellen von Diabetikern, ihre Bedeutung für den Lipoproteinstoffwechsel und deren Beeinflussung durch die Diabeteseinstellung liegen nicht vor.

Die nachfolgenden Untersuchungen sollten zur Klärung von Ursachen für Prädisposition und Entwicklung der Arteriosklerose beim Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie beitragen. Da deren detaillierte Analyse in vivo nur begrenzt möglich ist, wurden mesenchymale Zellen von Diabetikern, Hyperlipämikern und Stoffwechselgesunden auf ihre Wachstumseigenschaften und auf Veränderungen des Protein- und Lipoproteinstoffwechsels unter Zellkulturbedingungen untersucht. Im einzelnen wurden folgende Fragen geprüft:

1. Liegen zellassoziierte Änderungen
   a) des Wachstums
   b) des Lipoproteinstoffwechsels und
   c) der Ausstattung mit lysosomalen und extralysosomalen Proteasen in mesenchymalen Zellen von Diabetikern und Hyperlipämikern vor, die in der Zellkultur persistieren und mit Änderungen des Zellstoffwechsels einhergehen ?

2. Existieren bei Diabetikern und Hyperlipämikern im Vergleich zu Stoffwechselgesunden Serumfaktoren, die
   a) das Wachstum,
   b) die Proteinsynthese,
   c) den LDL- und HDL-Stoffwechsel sowie
   d) lysosomale und extra-lysosomale Proteasen dieser Zellen krankheitsspezifisch beeinflussen können?

3. Welche Aussagen sind über die Natur solcher Serumfaktoren möglich ?

4. Wie wirken sich die Interaktionen der unter 1. und 2. genannten zellulären und extrazellulären Faktoren auf den Zellstoffwechsel in vitro aus, und können diese Faktoren im Zusammenhang mit angiopathischen Veränderungen in vivo gebracht werden ?

## 2. Methodik

### 2.1. Material

Dulbecco's Modifikation des Eagle'schen Mediums (DME)(61,62) mit 5 mM Glukose;Penicillin-Streptomycin-Lösung (Endkonzentration im Zellinkubationsmedium: Penicillin 50 E/ml, Streptomycin 50 µg/ml; phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS), Seromed GmbH, München; Insulin Novo Actrapid$^{R}$ und Glukagon$^{R}$ von Novo Industrie-GmbH, Mainz; Seamless Cellulose Tubing 18/32 mit einer molekularen Ausschlußgrenze von 8.000 - 12.000 Daltons von Union Carbide Corp., Chicago, USA. Damit wurde bei der Dialyse Cytochrom C (Molekulargewicht 12.400 Daltons) vollständig zurückgehalten, während es für Insulin (Molekulargewicht 6.000 Daltons) voll durchlässig war. Spectra-Por 6 - Dialysemembranen mit einer vom Hersteller angegebenen oberen molekularen Ausschlußgrenze von 3.500 bzw. 1.000 Daltons von Spectrum Medical Industries Inc., Los Angeles, USA. Mit Spectra-Por 6 (3.500 Daltons) wurde bei der Dialyse Inulin (MG 5.000 Daltons) vollständig zurückgehalten, während es für Glukagon (MG 3.500 Daltons) voll durchlässig war. Mit Spectra-Por 6 (1.000 Daltons) wurde bei der Dialyse Glukagon vollständig zurückgehalten, während es für Vitamin B12 (MG 1.400 Daltons) noch zu 10 % durchlässig war. Pronase von Streptomyces griseus (Grad B, 45.000 Kunitz-Einheiten/Gramm, Chargennr. 502122) von Calbiochem, San Diego, USA; Trypsin vom Rind (Chargennr.: 54C-8220, mit Diphenylcarbamylchlorid behandelt zur Inaktivierung von Chymotrypsin) und Cycloheximid (Chargennr.: 41 C-2610) von Sigma, St. Louis, USA; 7-Keto-Cholesterin von Steraloids, Wilton, USA; Cholesterin (99 % rein) von Applied Science Laboratories, State College, USA. Falcon-Gewebekulturflaschen und -schalen von Beckton & Dickinson, Heidelberg; (6-H-3) Thymidin

(spezifische Aktivität 27 Ci/mmol); L-(U-C14)-Leucin (spez. Akt. 59 µCi/mmol); DL-(1-C14)-Prolin (spez. Akt. 282 µCi/mmol), (J-125)-Natriumjodid (trägerfrei in 0,05M NaOH) von Amersham Buchler GmbH, Braunschweig; (C14)-Hämoglobin (spez. Akt. 1,3 - 1,7 µCi/mmol) wurde von Dr. Dahlmann, Biochemische Abteilung des Diabetes-Forschungsinstitutes Düsseldorf, nach den Angaben von Roth et al. (234) hergestellt und für die Cathepsin D-Bestimmung zur Verfügung gestellt. N-α-Benzoyl-DL-Arginin-ß-Naphtylamid, Dithiothreitol und Naphthylamin von Serva Feinbiochemika, Heidelberg; Leucin-b-Nitroanilid, 3,5-Diamino-Benzoesäure und Dimethylformamid von Merck, Darmstadt.

2.2. Serumarten

Venenblut wurde nach 12-15 Std. Nahrungskarenz morgens entnommen, eisgekühlt und anschließend sofort 15 Min. mit 1500 x g bei 4°C zentrifugiert, gemischt, durch Filtration (0,22 u) sterilisiert und portionsweise bei -20°C 1-3 Wochen tiefgefroren aufbewahrt. Benutzt wurden:

1) 16 verschiedene Mischseren von je 10-15 mit Sulfonylharnstoffen behandelten Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung ohne Ketose (Nüchternblutglukose > 200 mg/dl, Urinzuckerausscheidung in den vorangegangenen 24 h > 10 g; in den voraufgegangenen 4-8 Wochen 1-2 ähnlich schlechte Stoffwechseleinstellungen bei ambulanter Kontrolle, letzte Sulfonylharnstoffeinnahme bei 1-3) 12-15 Std. vor Blutentnahme ),
2) 5 verschiedene Mischseren von sulfonylharnstoffbehandelten Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (Nüchternblutglukose < 125 mg/dl; keine Urinzuckerausscheidung während der vorangegangenen 24 Std., keine Ketose, in den voraufgegangenen 8 Wochen mehrere Blutglukosetagesprofile < 150 mg/dl bei ambulanter Kontrolle),

3) Einzelseren von 4 sulfonylharnstoffbehandelten Diabetikern vor und nach 3-5-wöchiger Diabetesbehandlung.
4) 11 verschiedene Mischseren von je 6-10 Patienten mit primärer Hyper-LDL-Cholesterinämie und
5) 14 verschiedene Mischseren von je 6-10 Stoffwechselgesunden.

Die Konzentrationsbereiche von verschiedenen charakteristischen Bestandteilen dieser Seren sind in den Tabellen 1-3 zusammengestellt.

Blutglukose wurde mit der Hexokinase-Methode (Boehringer-Mannheim), Serumcholesterin mit der Chod-Pap-Methode (Boehringer Mannheim) und Serumtriglyceride vollenzymatisch (Boehringer Mannheim) bestimmt. Die Serumkonzentrationen der folgenden Wachstumsfaktoren wurden dankenswerterweise in verschiedenen Forschungslaboratorien gemessen:

1) Insulin mittels RIA-Phadebas (Pharmacia, Freiburg) von Prof. Grüneklee, Diabetes-Forschungsinstitut, Düsseldorf,
2) Insulin like growth factor I und II mittels RIA von Prof. Froesch und Dr. Zapf, Universität Zürich,
3) Wachstumshormon mittels RIA (Serono, Freiburg) von Prof. Solbach, Universität Düsseldorf.

Alpha-2-Makroglobulin und Alpha-1-Antitrypsin im Serum wurden mit LC-Partigenplatten (Behring, Marburg) bestimmt.

Zur Abtrennung von Substanzen mit einem Molekulargewicht $<$12.000 Daltons wurde das Serum mit Seamless Cellulose Tubing 18/32 unmittelbar vor dem jeweiligen Experiment 2x12 Std. bei 4°C gegen das 10fache Volumen von DME dialysiert. Die Wachstumseffekte von undialysiertem Serum und dialysierter Serumfraktion der gleichen Serumcharge wurden in Parallelansätzen miteinander verglichen. Zur

Untersuchung des wachstumsstimulierenden Effektes der niedermolekularen Serumfraktion (Molekulargewicht < 12.000 Daltons) wurde das jeweilige Serum 24 Std. bei 4°C gegen das 9fache Volumen von DME dialysiert. Zur Verringerung potentieller Veränderungen der niedermolekularen Substanzen im Außendialysat wurde das Zellwachstum gleichzeitig in diesem Außendialysat, das einem Inkubationsmedium von DME + 9 % (v/v) niedermolekularer Serumfraktionen entsprach in DME + 9 % dialysiertes Serum, im Außendialysat + 9 % dialysiertes Serum und in DME + 9 % nicht dialysiertes Serum der gleichen Charge bestimmt.

In prinzipiell gleicher Weise wurde auch zur Abtrennung und Testung von Substanzen aus dem Serum mit Spectra-Por 6 (molekulare Ausschlußgrenzen 3.500 bzw. 1.000 Daltons) - Dialysemembranen vorgegangen, wobei die Dialysezeiten auf 2 x 24 h bei 4°C verlängert wurden.

Zum Anzüchten der Fibroblastenkulturen aus Hautbiopsien sowie für die Untersuchungen an tierischen Zellen wurde foetales Kälberserum von Seromed GmbH, München eingesetzt.

Lipoproteinfreies Serum (LDS) wurde aus den Mischseren dadurch gewonnen, daß man die Dichte des jeweiligen Serums auf 1,24 g/l mit KBr einstellte und 72 h bei 180.000 x g zentrifugierte. Nach Entfernung des lipoproteinhaltigen Überstandes wurden der Unterstand 72 h mehrfach gegen 0,15 M NaCl und zuletzt gegen Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung dialysiert (Seamless Cellulose Tubing 18/32) und auf den ursprünglichen Proteingehalt des Serums eingestellt. Der Cholesteringehalt solcher lipoproteinfreien Serumpräparationen lag unter 2,5 µg/ml.

Tabelle 1a

Konzentrationsbereiche verschiedener Serumbestandteile (IGF: insulin like growth factor; STH: Wachstumshormon
1) von nicht ketotischen Typ II-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (NIDDM/DS) (n=12)
2) von Typ II-Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (NIDDM/DS+) (n=5)
3) von Patienten mit Hyper-LDL-Cholesterinämie (HS) (n=11) und
4) von Stoffwechselgesunden (Kontrollen/NS) (n = 14)

| | Glukose mg/dl | Cholesterin mg/dl | Triglyceride mg/dl | Insulin µU/ml | IGF I µU/ml | IGF II µU/ml | STH ng/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NIDDM (DS) | 205-245 | 180-225 | 218-249 | 22-34 | 122-255 | 700-770 | 2,0-3,5 |
| NIDDM (DS+) | 110-125 | 126-209 | 87-170 | 18-28 | - | - | 1,5-3,5 |
| HS | 92-110 | 243-339 | 77-154 | 8-16 | - | - | 2,4-4,5 |
| Kontrollen (NS) | 90-100 | 142-159 | 42-104 | 7-14 | 102-228 | 620-700 | 2,0-4,0 |

Tabelle 1b

$\alpha_2$-Makroglobulin- und $\alpha_1$-Antitrypsin-Konzentrationen in je 5 Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS), von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) und von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie (HS) Mittelwert ± SEM

| | NS | DS | HS |
|---|---|---|---|
| $\alpha_2$-Makroglobulin (mg/dl) | 237 ± 3 | 236 ± 6 | 216 ± 28 |
| $\alpha_1$-Antitrypsin (mg/dl) | 273 ± 10 | 244 ± 6 | 269 ± 10 |

Tabelle 2

Glukose-, Cholesterin- und Triglyceridgehalt in Mischseren von 5 Gruppen schlecht eingestellter (DS) und 5 anderer Gruppen gut eingestellter (DS+) nicht insulinbedürftiger Diabetiker (NIDDM) sowie von 4 Gruppen Stoffwechselgesunder (NS)

| Mischseren | Glukose (mg/dl) | Cholesterin (mg/dl) | Triglyceride (mg/dl) |
|---|---|---|---|
| NIDDM schlecht eingestellt | | | |
| $DS_1$ | 238 | 201 | 170 |
| $DS_2$ | 248 | 239 | 190 |
| $DS_3$ | 239 | 201 | 234 |
| $DS_4$ | 225 | 188 | 147 |
| $DS_5$ | 297 | 201 | 167 |
| NIDDM gut eingestellt | | | |
| $DS+_1$ | 125 | 126 | 139 |
| $DS+_2$ | 112 | 209 | 170 |
| $DS+_3$ | 110 | 159 | 95 |
| $DS+_4$ | 115 | 188 | 119 |
| $DS+_5$ | 125 | 166 | 87 |
| Kontrollseren | | | |
| $NS_1$ | 98 | 120 | 77 |
| $NS_2$ | 96 | 154 | 102 |
| $NS_3$ | 100 | 146 | 104 |
| $NS_4$ | 100 | 150 | 68 |

Tabelle 3

Glukose-, Cholesterin- und Triglyceridgehalt von Einzelseren (DS) nicht ketotischer nicht insulinbedürftiger Diabetiker (NIDDM) vor und nach Behandlung über 3-5 Wochen.

| NIDDM (Einzelseren) | Vor Behandlung | | | Nach Behandlung | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Glukose (mg/dl) | Cholesterin (mg/dl) | Triglyceride (mg/dl) | Glukose (mg/dl) | Cholesterin (mg/dl) | Triglyceride (mg/dl) |
| $DS_1$ | 233 | 299 | 273 | 170 | 188 | 156 |
| $DS_2$ | 365 | 179 | - | 186 | 234 | - |
| $DS_3$ | 262 | 281 | 223 | 166 | 185 | 87 |
| $DS_4$ | 401 | 433 | 320 | 80 | 214 | 121 |

2.3. Präparationen der Lipoproteine

Die Lipoproteine niederer bzw. hoher Dichte (LDL bzw. HDL) wurden aus den Mischseren von Diabetikern, von Stoffwechselgesunden und von Duroc-Schweinen in typischer Weise mittels Dichteultrazentrifugation isoliert (116). LDL wurde im Dichtebereich von d = 1.020 - 1.063 g/ml und HDL im Bereich von d = 1.090 - 1.21 g/ml isoliert und weiter durch erneutes Zentrifugieren im entsprechenden Dichtebereich gereinigt. Diese Lipoproteinfraktionen wurden gegen 0,15 M NaCl + 0,01 % EDTA dialyisert und mittels Millipor-Filter (0,22 µ Porendurchmesser) sterilisiert. Die Reinheit dieser Lipoproteinfraktionen wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese, mit der Immundiffusionsmethode nach Ouchterloni mit spezifischen Antiseren gegen menschliches Apoprotein B und A-I und elektronenmikroskopisch überprüft.

Diese LDL- und HDL-Fraktionen wurden in Glycin-NaOH-Puffer, pH 10, in Anlehnung an die Jodmonochloridtechnik von Mc Farlane jodiert (168). Jodmonochlorid wurde zusammen mit Na-$^{125}$J und LDL-Protein (MG 200.000 Daltons) bzw. mit HDL-Protein (MG 50.000 Daltons) in einem molekularen Verhältnis von 10:1 bzw. 5:1 vermischt, wodurch man ein jodiertes LDL mit 1-1,5 Jodatomen /Proteinmolekül erhielt. $^{125}$J-LDL bzw. $^{125}$J-HDL wurden mit mehreren Wechseln gegen 0,15 M NaCl + 0,01 % EDTA dialysiert, anschließend mittels Millipor-Filter sterilisiert (s.o.) und davon Proben zur Bestimmung des Proteins nach Lowry (166) und der Radioaktivität entnommen. Die spezifischen Aktivitäten lagen im Bereich 80-460 CPM/ng Proteinanteil der Lipoproteine. Auf diese Weise markiertes LDL und HDL zeigten das gleiche elektrophoretische Verhalten wie unmarkierte LDL und HDL in der Agarosegelelektrophorese. Weniger als 1 % des gesamten 125-Jod war in 10 % Trichloressigsäure löslich. Weniger als 3 % 125-Jod waren im Lipidanteil der Lipo-

proteine enthalten (extrahiert mit Chloroform-Methanol 2:1). Für die Lipoproteinexperimente wurden nur solche Lipoproteinfraktionen verwendet, die nicht älter als 4 Wochen, vom Zeitpunkt der Blutentnahme an gerechnet, waren.

2.4. Zellinien

Fibroblasten und arterielle glatte Muskelzellen wurden in Kultur gehalten und für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt. Fibroblastenkulturen wurden in folgener Weise angelegt: freiwilligen Personen, die mit der Biopsie einverstanden waren, wurde eine ca. 3x3 mm Hautbiopsie aus dem Oberarmbereich unter sterilen Bedingungen in Lokalanaesthesie entnommen. Das Gewebestück wurde in PBS gewaschen, mit einem Skalpell zerkleinert und unter Deckplättchen in Plastikgewebekulturschalen (60 mm Ø = 28,3 $cm^2$) in DME + 10 % (v/v) foetales Kälberserum in einem Brutschrank bei 37°C in 5 % $CO_2$/95 % angefeuchteter Luft 3-4 Wochen bei 2maligem Mediumwechsel/Woche gezüchtet. Nachdem die ausgewachsenen Fibroblasten mit typischem licht- und elektronenmikroskopischem Aussehen einen ersten konfluenten Monolayer gebildet hatten, wurden sie mit 0,05 %iger Trypsinlösung abgelöst, im Verhältnis 1:2 auf Gewebekulturflaschen verteilt und in dieser Weise zur weiteren Zellzahlvermehrung bis zur 2.-4.Passage weitergezüchtet. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Teil der Fibroblasten in DME unter Zusatz von 20 % foetalem Kälberserum (v/v) und 1,28 M DMSO unter kontrollierten Bedingungen in flüssigem Stickstoff eingefroren ($2x10^6$ Fibroblasten/ml je Ampulle; kontinuierliche automatisch gesteuerte Temperaturaufnahme von 1°C/Min. bis -80°C., Einfriergerät von Union Carbide, Chicago, USA). Von auf diese Weise eingefrorenen Fibroblasten waren mindestens 85 % beim Wiederauftauen voll funktionsfähig (Trypanblautest). Die tiefgefrorenen Ampullen wurden bei -196°C aufbewahrt und bei Bedarf entnommen.

Die in Tab. 6a genannten Zellinien Nr. 1 und 2 wurden von Prof. Steinberg, University of California, San Diego, USA und in Tab. 6b, Nr. 9 von Prof. Barth, Universität München, zur Verfügung gestellt. Die Zellinien Nr. 5-8 in Tab. 6a wurden von Patienten einer niedersächsichen Familie (Abb. 1) entnommen, die von Prof. Canzler, Medizinische Hochschule Hannover, betreut werden. In diesen Fällen stammen die klinischen Angaben zu den Fibroblastenspendern und die Diagnose der Hyperlipoproteinämie von den genannten betreuenden Ärzten. Von den übrigen Fibroblastenspendern wurden die klinischen Daten und die Diagnosen in der Klinischen Abteilung des Diabetes-Forschungsinstitutes während ambulanter und stationärer Aufenthalte erstellt.

Die Primärkulturen der 2 arteriellen glatten Muskelzelllinien wurden in den in Tab. 8 angegebenen Zellkulturlabors in typischer Weise angelegt (229) und auf Zellspezifität überprüft. Dabei wurde der jeweils entnommene Arterienabschnitt nach Reinigung von anderen Gewebsresten im Bereich der Intimaoberfläche mehrfach longitudinal und transversal 0,5 mm tief eingeschnitten und eine dünne Intima-Medialage zurückgestreift und verworfen. Darunter wurde eine 0,2 - 0,4 mm dünne Medialage entnommen, weiter zerkleinert und danach in ähnlicher Weise wie die Fibroblastengewebe in DME + 10 % foetales Kälberserum bei $37^{o}C$ im $CO_2$-Brutschrank weitergezüchtet. In der 3.-4. Passage wurde ein Teil dieser Zellinien ins Diabetes-Forschungsinstitut überführt, unter den oben dargestellten Bedingungen weitergezüchtet, eingefroren, in Ampullen bei $-196^{o}C$ aufbewahrt und bei Bedarf entnommen (69,76,82,86).

Zusätzlich wurden 3 arterielle glatte Muskelzellinien, die aus der Media der Aorta thoracica von 3-6 Monate alten

Hampshire- und Duroc-Schweinen in vergleichbarer Weise gewonnen wurden, zwischen der 5. und 10. Passage untersucht. Diese arteriellen glatten Muskelzellinien wurden von Dr. Carew, University of California, San Diego, USA etabliert und für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Durch den Einfriervorgang wurden das Wachstum, der Proteinwie der Lipoproteinstoffwechsel im Vergleich zu sofort untersuchten, nicht eingefrorenen Zellen nicht verändert. Für diese Untersuchungen wurden Zellen in der 2.-10. Passage benutzt. Passagebedingte Unterschiede waren in diesem Bereich nicht nachweisbar. Alle Zellinien wurden auf Mykoplasmen untersucht und waren frei von Mykoplasmenkontaminationen (11 ).

Klinische, für die Zellkultur potentiell relevante Daten von den Zellinien verschiedener Diabetiker, Hyperlipämiker und Stoffwechselgesunder, die für die verschiedenen Experimente benutzt wurden, sind in den Tab. 4 - 8 zusammengestellt:

Zellinien ( Hautfibroblasten ) von Patienten mit primärem Diabetes mellitus ( D )

| | Geschlecht | Alter (Jahre) | D - Typ | D-Dauer (Jahre) | Familiäre D - Belastung | D - Langzeiteinstellung | D- Spätschäden |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | w | 10 | IDDM | 1 | ja | schlecht | keine |
| | w | 17 | IDDM | 3 | ja | schlecht | keine |
| | w | 22 | IDDM | 5 | ja | schlecht | keine |
| | w | 25 | NIDDM | 2 | ja | optimal | keine |
| | m | 35 | NIDDM | 1 | ja | schlecht | keine |
| | m | 40 | NIDDM | 3 | ja | schlecht | keine |
| | w | 40 | NIDDM | 5 | ja | schlecht | keine |

Zellinien ( Hautfibroblasten ) von Pankreatektomierten mit sekundärem insulinpflichtigem Diabetes mellitus ( s. D ) nach totaler Pankreatektomie

| | Geschlecht | Alter (Jahre) | Vorerkrankung | s.D - Dauer ( Jahre) | Famil. D - Belastung | s.D.-Langzeit-einstellung | s.D-Spät-schäden |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | m | 41 | Pankreatitis | 2 | nein | schlecht | keine |
| 2 | m | 42 | Pankreatitis | 2 | nein | schlecht | keine |
| 3 | m | 44 | Pankreatitis | 2 1/2 | nein | schlecht | keine |
| 4 | m | 45 | Pankreaskrebs | 1 1/2 | nein | schlecht | keine |
| 5 | m | 48 | Pankreatitis | 3 1/2 | nein | optimal | keine |

Tabelle 6 a

Zellinien (Hautfibroblasten) von Patienten mit verschiedenen Formen primärer Hyperlipoproteinämie (HLP)

| | HLP-Art | Familiäre HLP-Belastung | Geschlecht | Alter (Jahre) | HLP-Dauer seit Diagnose (Jahre) | HLP-Langzeiteinstellung ( Serum-LP-Spiegel) | HLP-Spätschäden |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Hyper-LDL-Cholesterinämie | bd.Eltern + 1 Schwester | w | 19 | 10 | LDL | Herzinfarkt |
| 2 | Hyper-LDL-Cholesterinämie | bd.Eltern + 1 Schwester | w | 21 | 11 | LDL | Herzinfarkt |
| 3 | Hyper-LDL-Cholesterinämie | 1 Elternteil + 1 Bruder | w | 23 | 7 | LDL | Xanthome (tuberöse) koronare Herzkrankheit |
| 4 | Hyper-LDL-Cholesterinämie | 1 Elternteil + | w | 14 | 5 | LDL | Xanthome (tuberöse) |
| 5 | Hyper-LDL-Cholesterinämie | s. Abb. 1 | w | 53 | 12 | LDL | Herzinfarkt |
| 6 | Hyper-HDL-Cholesterinämie | s. Abb. 1 | m | 51 | 6 | HDL | koronare Herzkrankheit |
| 7 | Hyper-HDL+LDL-Cholesterinämie | s. Abb. 1 | w | 31 | 6 | HDL und LDL | ø |
| 8 | Hyper-HDL+LDL-Cholesterinämie | s. Abb. 1 | m | 11 | 1 | HDL und LDL | ø |

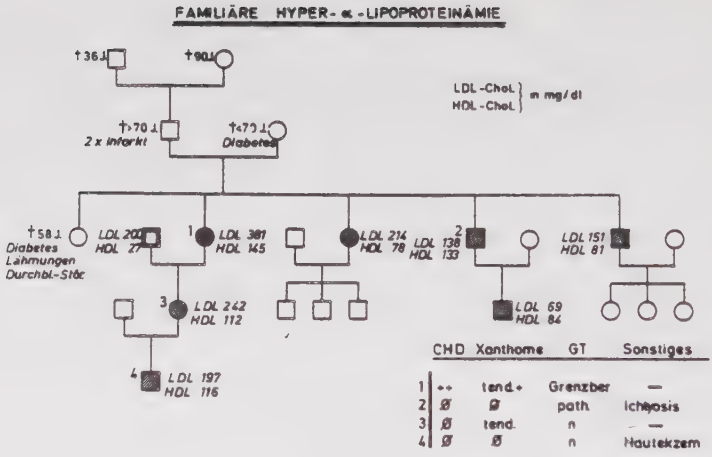



Abb. 1:
Stammbaum einer Familie aus Niedersachsen mit vertikaler Transmission einer Hyper- α -Lipoproteinämie über mindestens 3 Generationen.

Tabelle 6 b

Zellinien (Hautfibroblasten) von Patienten mit verschiedenen Formen primärer Hyperlipoproteinämie (HLP)

| | HLP-Art | Familiäre HLP-Belastung | Geschlecht | Alter (Jahre) | HLP-Dauer seit Diagnose (Jahre) | HLP-Langzeiteinstellung (Serum-LP-Spiegel) | HLP-Spätschäden |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 9 | Hyper-VLDL-Triglyceridämie | Mutter + 1 Schwester | m | 34 | 10 | VLDL | koronare Herzkrankheit |
| 10 | Hyper-VLDL-Triglyceridämie | Vater,1 Bruder + 1 Tochter | m | 46 | 16 | VLDL | Herzinfarkt, Hypertonie |
| 11 | Hyper-VLDL-Triglyceridämie | Mutter,1Schwester 1 Tochter | m | 48 | 14 | VLDL | koronare Herzkrankheit periph.arter.Durchblutungsstör.Apoplex,Hypertonie |
| 12 | Hypercholesterin- + triglyceridämie (Typ III n. Fredrickson) | Vater | m | 62 | 13 | ß-VLDL | Herzinfarkt,Hypertonie, Xanthome,periphere art. Durchblutungsstörungen |
| 13 | Hypercholesterin- + triglyceridämie (Typ III n. Fredrickson) | Vater,1 Bruder 1 Schwester | w | 63 | 19 | ß-VLDL | Herzinfarkt, Hypertonie Xanthome,periphere art. Durchblutungsstörung |

Tabelle 7

Zellinien ( Hautfibroblasten ) von Stoffwechselgesunden ( NF )

| | Geschlecht | Alter (Jahre) |
|---|---|---|
| 1 | m | 17 |
| 2 | m | 22 |
| 3 | w | 27 |
| 4 | m | 31 |
| 5 | m | 37 |
| 6 | w | 41 |
| 7 | m | 44 |
| 8 | m | 49 |

Tabelle 8

Zellinien ( arterielle glatte Muskelzellen ) von nichtdiabetischen Patienten

| | Geschlecht | Alter (Jahre) | Gewebeursprung | Anlaß für Entnahme | Zellkulturlabor der Primärkultur |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | m | 20 | Arteria femoralis | Tod nach Verkehrsunfall | Prof. Steinberg, University of California, San Diego, USA |
| 2 | m | 57 | Aorta abdominalis | Operation eines Aneurismas bei Aortensklerose | Prof. Ditschuneit, Universität Ulm |

2.5. Messung des Zellwachstums und der Proteinsynthese

In standardisierter Weise wurden für alle Untersuchungen jeweils 1 x $10^5$ Zellen pro Zellkulturschale (60 mm Ø) in 3 ml DME, dem in der Regel 10 % (v/v) des entsprechenden Humanserums bzw. der Humanserumfraktion zugesetzt waren, bei 37°C in 5 % $CO_2$/95 % angefeuchteter Luft inkubiert. Zahl und Häufigkeit des Inkubationsmediumwechsels, der einzelnen Meßpunkte und die Gesamtversuchsdauer gehen im Detail aus den einzelnen Ergebnisabbildungen hervor. Sofern nicht ausdrücklich erwähnt, wurden in der Regel die Untersuchungen unter lichtmikroskopischer Kontrolle bis zum Erreichen eines konfluenten Stadiums mit vollständiger Bedeckung des Schalenbodens durch Zellen durchgeführt.

Zu den einzelnen Meßzeitpunkten wurden die Zellen mit 0,05 % Trypsinlösung 3-4 Min. unter lichtmikroskopischer Kontrolle von der Plastikschale ab- und aus dem Zellverband herausgelöst und im Coulter-Counter Modell ZB I dreifach pro Schale gezählt(246).Je Meßpunkt wurden die Zellzahlen von 4 Parallelschalen bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Der Variationskoeffizient der Zellzahlbestimmung beträgt 1,7 %. Der Variationskoeffizient für das Wachstum von am gleichen Tage unter gleichen Bedingungen getrennt angesetzten Zellen einer Zellinie beträgt während einer Wachstumsphase bis zur Konfluenz 3,3 %. Der Gesamtproteingehalt pro Platte wurde nach Entfernung der Serumproteine von 3 Zellkulturschalen pro Meßpunkt nach Lowry (166) bestimmt (Variationskoeffizient: 2,3 %).

4 Std. und 20 Std. nach Zugabe von H3-Thymidin (5 µCi/ml Inkubationsmedium), C14-Leucin (0,25 µCi/ml) oder C14-Prolin(0,25 µCi/ml) wurde deren Einbau in DNS bzw. Zellproteine in 3-4 Zellkulturschalen/Meß-

punkt bestimmt. Die Plastikschalen wurden auf Eis gekühlt. Nach Entnahme einer Probe (1,5 ml) des extrazellulären Mediums wurden die Zellen 6 mal hintereinander mit je 3 ml eiskalter PBS gewaschen und abtrypsiniert (0,05 % Trypsin, 3-5 Min., 37°C). Die Mediumprobe und die trypsinierten Zellen wurden mit eiskalter 50 % Trichloressigsäure (0,5 ml/ml Probe) präzipitiert, zentrifugiert (2500 x g, 15 Min., 4°C), das Pellet 2 mal mit je 4 ml Äther-Äthanol (1:1 v/v) 5 Min. bei 20°C gewaschen und jeweils erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 N NaOH aufgelöst und die in einer Probe enthaltene Radioaktivität gemessen.

2.6. Messung von Lipoprotein-Bindung, -Aufnahme und -Abbau

Für die Lipoproteinversuche wurden jeweils $1 \times 10^5$ Zellen/Zellkulturschale (28 $cm^2$) angesetzt. Diese Zellen wurden in 3 ml DME + 10 % des jeweiligen Diabetiker- oder Kontrollserums (v/v) bei 37°C in 5 % $CO_2$/ 95 % angefeuchteter Luft mit einem Mediumwechsel jeden 2. Tag gezüchtet. 24 h vor Lipoproteinzugabe wurde das Zellkulturmedium durch 3 ml frisches DME + 5 % lipoproteinfreies Serum (LDS) des gleichen Serumtyps ersetzt.

Bei Versuchen zur Lipoproteinrezeptorregulation wurde die Lipoproteinbindung sowohl vor dem Mediumwechsel zu DME + 5 % LDS als auch nach 24 h in diesem Medium mit und ohne Zusatz von 7-Keto-Cholesterin (2,5 µg/ml) oder 7-Keto-Cholesterin (2,5 µg/ml) + Cholesterin (12,5 µg/ml) oder Cylcoheximid (210 µg/ml) gemessen .

Zu Beginn der Inkubation der Zellen mit Lipoproteinen erfolgte der letzte Wechsel des Inkubationsmediums. Die Zellen wurden mit 2 ml DME + 5 % LDS, die verschiedene Konzentrationen (1-500 µg Apoprotein/ml) radioaktiv markierter LDL, HDL, unmarkierter LDL oder HDL einzeln oder in Kombination enthielten, über verschiedene Zeiten (2-6 h) bei 37°C inkubiert.

In Ergänzung wurden die Zellen auch bei 0°C 2 h mit radioaktiv markierten Lipoproteinen inkubiert, um zwischen alleiniger Bindung der Lipoproteine an die Oberfläche der Zellmembran und der zusätzlichen Aufnahme in die Zelle zu unterscheiden. Da bei 0°C kein Stoffwechsel der Lipoproteine erfolgt, wurde die Lipoproteinbindung auf der Basis der gesamten zellassoziierten Radioaktivität berechnet. Für die Untersuchungen bei 0°C wurden die Zellkulturschalen zuerst 15 Min. in Eis plaziert und 3 x mit 3 ml eisgekühlter PBS gewaschen. Erst danach erhielten die Zellen das eisgekühlte Inkubationsmedium mit den radioaktiv markierten Lipoproteinen und wurden während der gesamten Inkubationszeit auf Eis in einem 4°C-Raum gehalten.

Die Regenerationsfähigkeit der Lipoproteinrezeptoren nach vorhergehender proteolytischer Abspaltung wurde folgendermaßen geprüft: Nach 24 Std. Inkubation mit DME + 5 % LDS wurden die Zellen mit 2 x 3 ml PBS gewaschen und 20 Min. bei 37°C in DME + Pronase (1 µg/ml) inkubiert. Darauf erfolgte eine erneute 3 x 3 ml PBS-Wäsche und eine Inkubation in DME + 5 % LDS über 2-12 Std. Daran wurde eine 2 Std.-Inkubation bei 0°C mit einem letzten Wechsel des Inkubationsmediums angeschlossen, dem radioaktiv markierte Lipoproteine zugesetzt waren. Damit sollte die Zeitspanne bestimmt werden, die die jeweiligen Zellen benötigen, um die Ausgangbindungsfähigkeit für LDL bzw. HDL wieder zu erreichen.

Prinzipiell gleich wurde die Resistenz der Rezeptoren gegenüber proteolytischen Enzymen (1 µg Pronase/ml; 1 µg Trypsin/ml) gemessen.Dabei wurde nur direkt an eine 2. PBS-Wäsche, die in diesem Fall bei 0°C durchgeführt wurde, eine 2 Std.-Inkubation bei 0°C angeschlossen mit frischem Medium + radioaktiv markierten Lipoproteinen.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen auf 0°C abgekühlt und das Inkubationsmedium für die Messung der 125-Jod-haltigen Abbauprodukte abpippetiert. Danach wurden die Zellen 6 x hintereinander mit je 3 ml eisgekühlter PBS gewaschen. 2 %-ige Albuminzusätze führten zu keiner wesentlichen Änderung des Waschergebnisses. Die verbleibenden zellassoziierten Lipoproteine wurden weiter aufgetrennt in eine von der Zelloberfläche ablösbare = oberflächengebundene und nicht mehr ablösbare = intrazellulär aufgenommen Fraktion. Dafür wurden die Zellen 3-5 Min. bei 37°C mit 0,05 % Trypsin in einer Pufferlösung inkubiert, die 137 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 5,55 mM Dextrose, 6,9 mM $NaHCO_3$ und 0,54 mM EDTA enthielt. Danach wurden die mit Trypsin inkubierten Zellen unter Zusatz von 2 x 1 ml 10 % Serumproteinlösung zur Trypsinhemmung eingesammelt und 10 Min. bei 4°C und 3000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS von Serumproteinkontaminationen freigewaschen und die Gesamtmenge der im Zellpellet und ein Aliquot der freigesetzten, im Zellüberstand enthaltenen Radioaktivität bestimmt. Danach wurde das Zellpellet in 0,2 ml 1 N KOH aufgelöst, 16 Std. bei 37°C inkubiert und nach Verdünnung mit Aqua bidest. auf 1 ml ein Aliquot zur Proteinbestimmung (166) aufgearbeitet.

Der Abbau von 125-Jod-LDL bzw. HDL zu radioaktiv markierten Produkten wie 125-Jod-Tyrosin, die in 15 % Trichloressigsäure löslich sind, wurde in einem Aliquot (1 ml) des Inkubationsmediums gemessen. Um Verfälschungen der Meßergebnisse durch freies 125-Jod in den Proben zu vermeiden, wurde das radioaktiv markierte, freie Jod aus dem Überstand des mit Trichloressigsäure ausgefällten Probenpellets dadurch entfernt, daß das freie Jod mit $H_2O_2$ oxidiert und als $J_2$ mit Chloroform extrahiert wurde (23 ).

Die Ergebnisse basieren auf der verbleibenden Radioaktivität in dem extrahierten Überstand. Von diesem Bruttoabbau wurde noch der durch Serumenzyme bewirkte Lipoprotenabbau abgezogen, der in parallel ohne Zellen aber mit gleichem Medium und unter gleichen Bedingungen inkubierte Zellkulturschalen bestimmt wurde. Die Addition der zellulär aufgenommenen und abgebauten Lipoproteine ergab die Gesamtmenge der metabolisierten Lipoproteine pro Gesamtinkubationszeit als Maß der Lipoproteinstoffwechselkapazität der Zelle.
Hinsichtlich der Lipoprotein-Bindung und Stoffwechselkapazität verschiedener Zellinien bzw. des Effektes verschiedener Seren wurden nur Zellinien mit ähnlicher Zelldichte zum Zeitpunkt der Messung herangezogen. Die Effekte von diabetischen und normalen Kontrollseren wurden stets im gleichen Experiment, unter gleichen Bedingungen, in Parallelansätzen einer Zellinie miteinander verglichen. Die Ergebnisse basieren auf Doppelmessungen aus jeweils 2 Zellkulturschalen pro Meßwert, wobei sich die Einzelwerte um weniger als 15 % vom Mittelwert unterschieden.

2.7. Messung der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität

Zur Bestimmung der intrazellulären Aktivität von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidase wurden die jeweiligen Zellinien von Diabetikern oder Hyperlipämikern gleichzeitig mit einer Kontrollzellinie eines Stoffwechselgesunden in DME mit Zusatz von 10 % (v/v) verschiedener Humanseren unter den bereits für das Zellwachstum genannten Bedingungen bis zur Konfluenz gezüchtet. 24 h vor der Aufarbeitung der Zellen wurde das Inkubationsmedium zum letzten Mal gewechselt. Davon wurden vor und nach 24 h Zellexposition Proben (1 ml) zur Bestimmung der extra-

zellulären Proteasenaktivität entnommen und bis zur gleichzeitigen Bestimmung der intrazellulären Proteasenaktivität am selben Tag bei $0^{o}C$ aufbewahrt. Zu Beginn der Aufarbeitung wurden die Zellkulturschalen (100 mm ø = 78,5 $cm^2$) auf $0^{o}C$ abgekühlt und 3 mal hintereinander mit je 8 ml eisgekühlter PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 8 ml PBS mit einem Plastikschaber eingesammelt und bei $4^{o}C$ 3 Min. mit 3000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml eisgekühlter PBS aufgeschwemmt und unter Eiskühlung 3 x 5 Sek. mit je 5 Sek.-Intervallen ultrabeschallt (Branson Sonifier Stufe 6). Eine längere Beschallungsdauer bis zu 40 Sek. ergab gegenüber 15 Sek. keine Änderung der gemessenen Proteasenaktivitäten. Nach der Beschallung wurde der Homogenisierungsstab zusätzlich mit 0,5 ml PBS abgespült, so daß das Gesamtvolumen des Zellhomogenates 1,5 ml betrug.

Je Versuchsansatz wurde eine Zellmenge mit einem Zellproteingehalt von 1 - 1,5 mg benötigt. Aus dem Homogenat wurden Proben zur Bestimmung des DNS- (127) und des Proteingehaltes (166) entnommen und das Homogenat mit PBS auf eine Proteinkonzentration von 200 µg/ml verdünnt. Wirkungsunterschiede verschiedener Seren auf die o.g. Proteasenaktivitäten in der gleichen Zellinie wurden mittels t-Test für verbundene Stichproben und Proteasenaktivitätsunterschiede zwischen verschiedenen Zellinien mittels t-Test für unverbundene Stichproben auf Signifikanz geprüft.

Cathepsin D (EC 3.4.2.3.5.) wurde unter Verwendung von $^{14}C$-Hämoglobin oder von $^{125}J$-LDL gemessen (14). Das Standardinkubationssystem enthielt in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml je Test: 1 M Natriumcitrat-HCL-Puffer, 6 mg $^{14}C$-Hämoglobin oder 200 µg $^{125}J$-LDL-Protein und

20 µg Protein des verdünnten Zellhomogenates. Der pH-Wert dieses Systems war auf das in Vorversuchen bestimmte pH-Optimum von pH 3,5 eingestellt. Der Test war linear im Bereich von Zellproteinkonzentrationen zwischen 10-40 µg je Probe und einer Inkubationsdauer zwischen 20 - 120 Min. Als Inkubationszeit für dieses Testsystem wurden 60 Min. bei 37°C gewählt. Der Reaktionsablauf wurde durch Zugabe von 0,3 ml eiskalter 50 % (w/v) Trichloressigsäure gestoppt. Das Proteinpräzipitat wurde 15 Min. mit 8000 x g (Eppendorf-Zentrifuge 3200) zentrifugiert. Leerwertproben, die PBS statt des Zellhomogenates enthielten, wurden parallel bestimmt. Freies $^{125}J$ wurde aus dem Überstand des mit Trichloressigsäure ausgefällten Probenpellets durch Oxidation mit $H_2O_2$ und nachfolgende Extraktion als $J_2$ mit Chloroform entfernt. Die Konzentration der durch Trichloressigsäure nicht präzipitierbaren Spaltpeptide bzw. des $^{125}J$- Tyrosinüberstands wurde anhand ihrer Radioaktivität bestimmt und diente als Maß der Cathepsin D-Aktivität. Die Enzymaktivität wurde bei Verwendung von $^{14}C$-Hämoglobin in CPM/µg DNS und bei Verwendung von $^{125}J$-LDL in ng abgebautem LDL-Protein/µg DNS angegeben.
Je Meßpunkt wurden 3 getrennte Proben untersucht.
Unter diesen Testbedingungen hemmte Pepstatin (5 mmol/l), ein spezifischer Cathepsin D-Blocker, nach einer 5-minütigen Vorinkubation der Zellhomogenatprobe die proteolytische Enzymaktivität nahezu vollständig.

Cathepsin B (EC 3.4.2.2.1.) wurde photometrisch unter Verwendung von N- $\alpha$ -Benzoyl-DL-Arginin-ß-Naphthylamid als Substrat gemessen (13). Das Standardinkubationssystem enthielt in einem Gesamtvolumen von 2,05 ml/Test: 0,2 M Phosphatpuffer, 1,3 mM $Na_2$-EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol 0,15 % (v/v), Äthanol, 40 µg Protein des Zellhomogenates und 0,1 mM Substrat. Der pH-Wert dieses Systems war auf

das in Vorversuchen bestimmte pH-Optimum von pH 5,5 eingestellt. Der Test war linear im Bereich von Zellproteinkonzentrationen zwischen 10 und 80 µg/Probe und einer Inkubationsdauer zwischen 5 und 25 Min. Als Inkubationszeit für dieses Testsystem wurden 20 Min. bei 37°C gewählt. Der Reaktionsablauf wurde durch Zugabe von 2 ml Barret'sches Farbreagenz ( 13) gestoppt. Die Konzentration des enzymatisch freigesetzten ß-Naphthylamins wurde bei 520 nm gemessen. Leerwertproben mit PBS statt des Zellhomogenates wurden parallel bestimmt. Die Standardkurve wurde mit ß-Naphthylamin erstellt und die Enzymaktivität in katal (= 1 mol Substratumsatz/sec)/µg DNS angegeben. Je Meßpunkt wurden 2 getrennte Proben untersucht. Unter diesen Testbedingungen hemmte Leupeptin (35 mmol/l), ein spezifischer Cathepsin B-Blocker, nach einer 5-minütigen Vorinkubation der Zellhomogenatprobe die proteolytische Enzymaktivität um 40-50 %.

Aminopeptidasen-Aktivität wurde photometrisch unter Verwendung von Leucin-p-Nitroanilid gemessen (286). Das Standardinkubationssystem enthielt in einem Gesamtvolumen von 0,7 ml/je Test 2,5 mM Substrat gelöst in 0,1 M Borat-Citrat-Phosphat-HCl-Puffer, der 5 % (v/v) Dimethylformamid enthielt und 10 µg Protein des Zellhomogenates. Der pH-Wert dieses Systems war auf das in Vorversuchen bestimmte pH-Optimum von pH 7,8 eingestellt. Der Test war linear im Bereich von Zellproteinkonzentrationen zwischen 2-20 µg/Probe und einer Inkubationsdauer zwischen 20-120 Min. Als Inkubationszeit für dieses Testsystem wurden 60 Min. bei 37°C gewählt. Der Reaktionsverlauf wurde durch Zugabe von 0,3 ml 8 % (w/v) Trichloressigsäure gestoppt.
Je Meßpunkt wurden 3 getrennte Proben untersucht. Die Enzymaktivität wurde in pkatal/µg DNS angegeben.

## 3. Ergebnisse

### 3.1.1.1. Zellulär fixierte Wachstumseigenschaften in Fibroblasten von Patienten mit primärem und sekundärem Diabetes mellitus.

Das Wachstum gezüchteter Fibroblasten von Patienten mit Typ I- oder Typ II-Diabetes mellitus (DF) und mit familiärer Diabetesbelastung, deren Stoffwechsel über 1 bis 5 Jahre seit der Diabetesmanifestation schlecht eingestellt war, ist im Vergleich zum Fibroblastenwachstum Stoffwechselgesunder (NF) der gleichen Altersgruppe um 25-92 % gesteigert (Abb. 2-4). Dabei wachsen DF sowohl mit Serum von Stoffwechselgesunden (NS) wie auch von Diabetikern (DS) schneller und zu einer höheren Zelldichte bei Konfluenz, wie aus den repräsentativen Wachstumskurven von einem nicht insulinbedürftigen, übergewichtigen und einem insulinbedürftigen normgewichtigen Diabetiker hervorgeht (Abb. 2 + 3).

Parallel zum Zellwachstum steigen auch der Proteingehalt und der $^{14}$C-Leucin-Proteineinbau/Platte an (Abb. 2). Proteingehalt und Zellzahl korrelieren bei DF und NF linear (Abb. 5). Während der logarithmischen Wachstumsphase der DF ist auch der 3-H-Thymidineinbau/Platte deutlich gesteigert, der sich erwartungsgemäß in der stationären Wachstumsphase bei Konfluenz normalisiert (Abb. 2). DNS- und Proteingehalt korrelieren bei DF und NF ebenfalls linear (Abb. 6a + b).

Das Wachstum aller gezüchteten Fibroblasten von 4 nicht übergewichtigen, pankreatektomierten, insulinbedürftigen Diabetikern ohne familiäre Diabetesbelastung (s.DF), deren Stoffwechsel über 1 1/2 - 2 1/2 Jahre nach der Pankreatektomie schlecht eingestellt war, ist im Vergleich zum Fibroblastenwachstum Stoffwechselgesunder der gleichen Altersgruppe um

15-87 % gesteigert (Abb. 7-10). Diese s.DF wachsen sowohl mit NS als auch mit DS ebenfalls schneller und zu einer höheren Zelldichte bei Konfluenz, wie aus den repräsentativen Wachstumskurven von verschiedenen s.DF hervorgeht (Abb. 8-10). Die unter vergleichbaren Bedingungen gegenüber diesen s.DF verminderte Wachstumsrate der NF kann aber durch wachstumssteigernde Faktoren, wie z.B. DS, deutlich und in einem den DF vergleichbaren Umfang erhöht werden (Abb. 8). Das Ausmaß der Wachstumssteigerung dieser s.DF gegenüber NF ist gleich groß wie das von Fibroblasten gleichaltriger, primärer, nicht insulinbedürftiger Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung (Abb. 9 + 10).

Im Gegensatz dazu unterscheidet sich das Fibroblastenwachstum von einem normgewichtigen, insulinbedürftigen pankreatektomierten Diabetiker ohne familiäre Diabetesbelastung, dessen Stoffwechsel über 3 1/2 Jahre seit der Pankreatektomie optimal eingestellt war, nicht vom Fibroblastenwachstum eines altersgleichen Stoffwechselgesunden (Abb. 11). In ähnlicher Weise unterscheidet sich auch das Fibroblastenwachstum von einem normgewichtigen, nicht insulinbedürftigen Diabetiker mit familiärer Diabetesbelastung, dessen Stoffwechsel über 2 Jahre seit der Erstmanifestation optimal eingestellt war, nicht vom Fibroblastenwachstum eines altersgleichen Stoffwechselgesunden (Abb. 12).

Proteingehalt und Zellzahl bzw. DNS-Gehalt korrelieren auch bei s.DF in linearer Weise wie bei DF und NF (Abb. 5, 6 a + b).

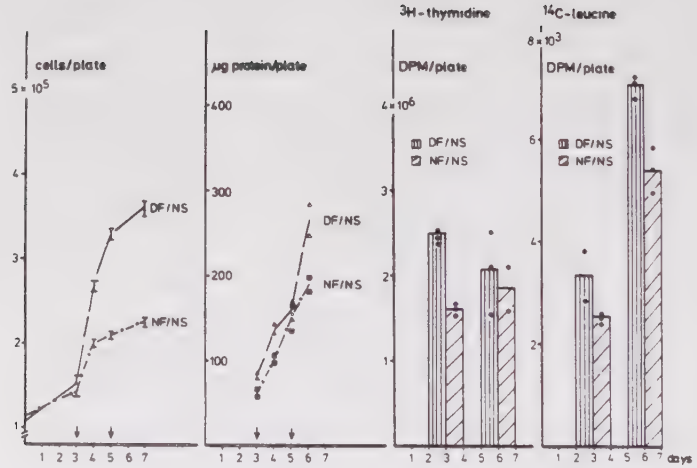



Abb. 2:
Vergleich von Wachstum, Proteingehalt (ug/Platte), 3H-Thymidin- und $^{14}$C-Leucineinbau (DPM/Platte) bei mit DME + 10 % Serum von Stoffwechselgesunden (NS) gezüchteten Fibroblasten von einem nichtinsulinbedürftigen, übergewichtigen Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DF) und von einem Stoffwechselgesunden gleichen Alters (NF).

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

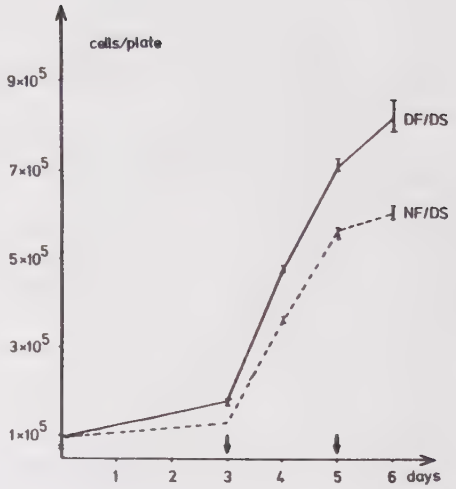



Abb. 3
Fibroblastenwachstum von einem insulinbedürftigen, normgewichtigen Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DF) und von einem gleichaltrigen Stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10 % Diabetikerserum (DS).

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

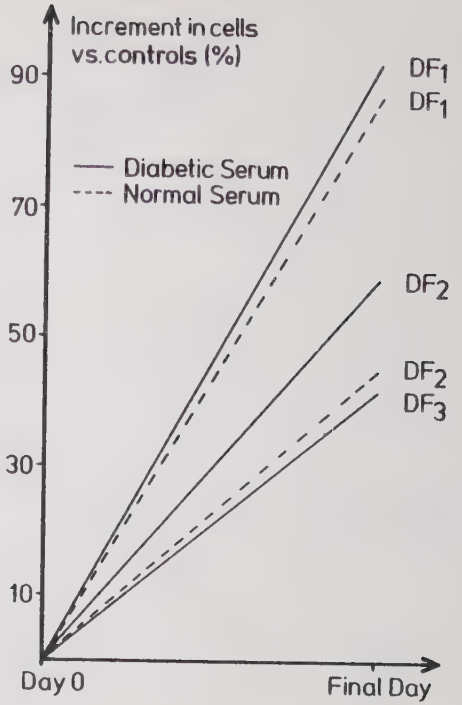



Abb. 4
Zusätzlicher prozentualer Anstieg der Fibroblastenzahl von 2 Typ I(DF1+3) und 1 Typ II-Diabetiker (DF2)mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DF) im Vergleich zu parallel mit Normal- oder Diabetikerserum 6-7 Tage gewachsenen Fibroblasten von 3 Stoffwechselgesunden aus vergleichbaren Altersgruppen.

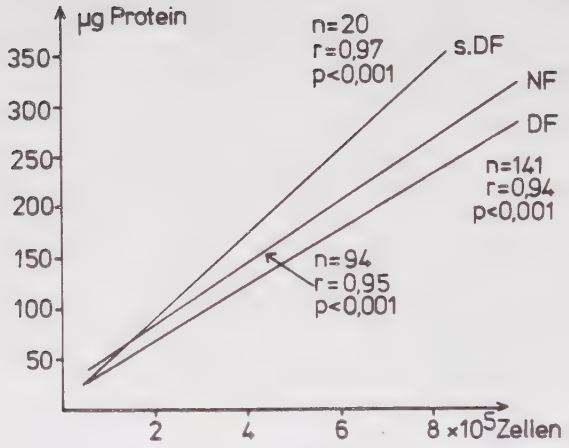
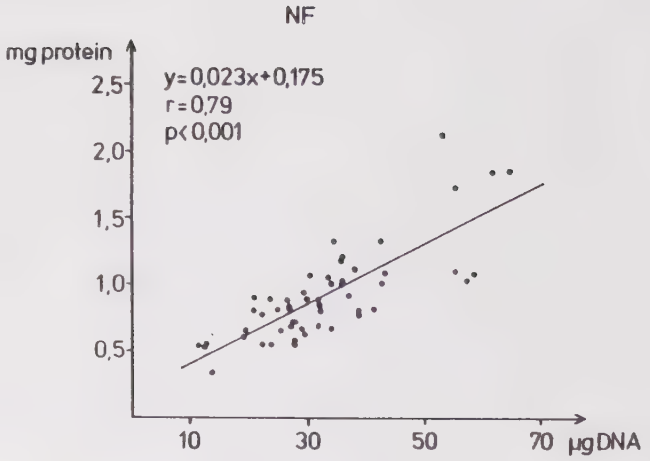



Abb. 5
Korrelation des Proteingehaltes zur Zellzahl von Fibroblasten Stoffwechselgesunder (NF: y = 29,8x+24,0 ), primärer Diabetiker (DF: y = 26,7x+14,8) und sekundärer Diabetiker (s.DF: y = 41,2x+6,0)



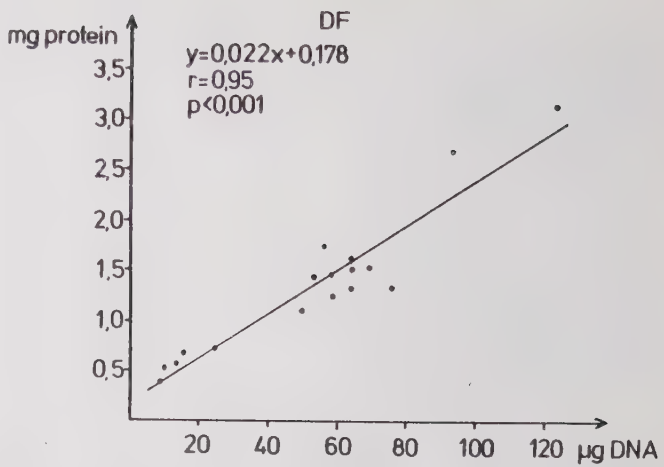




Abb. 6a:

Abb. 6b:

Korrelation des Proteingehaltes zum DNS-Gehalt von Fibroblasten Stoffwechselgesunder (NF ) und Diabetiker (DF)

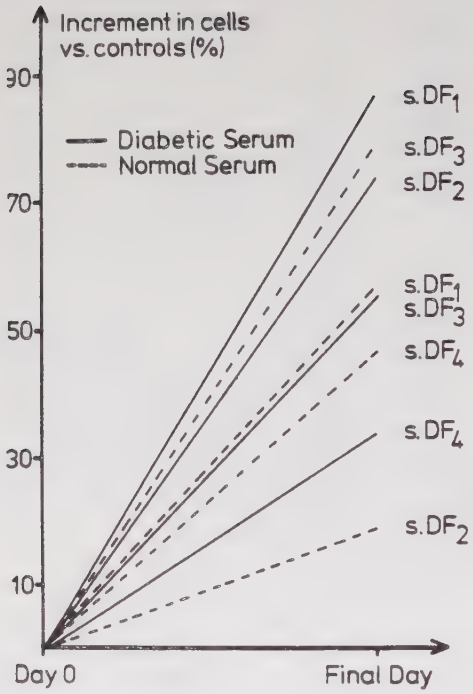



Abb. 7:
Zusätzlicher prozentualer Anstieg der Fibroblastenzahl von 4 pankreatektomierten insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (sDF)im Vergleich zu parallel mit Normal- oder Diabetikerserum 6-7 Tage gewachsenen Fibroblasten von 3 Stoffwechselgesunden aus der vergleichbaren Altersgruppe

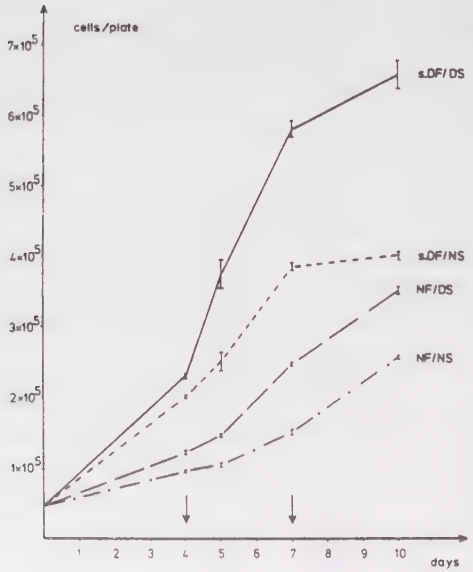



Abb. 8:
Fibroblastenwachstum von einem insulinbedürftigen untergewichtigen pankreatektomierten Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung(sDF) und von einem gleichaltrigen Stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10 % Diabetikerserum (DS) oder Normalserum (NS).

↓= Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

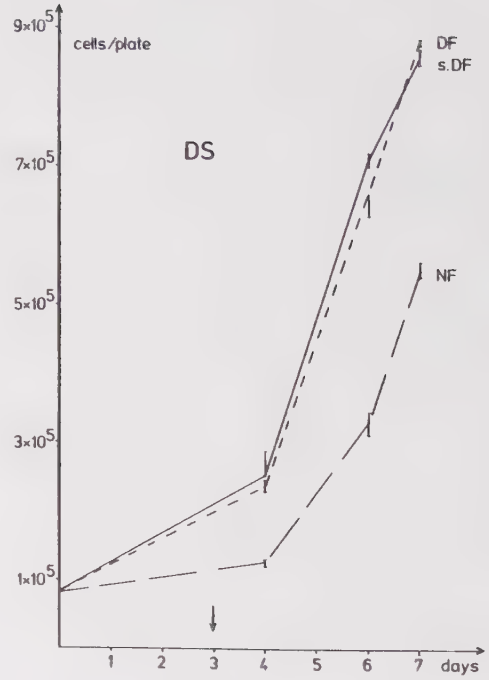



Abb. 9:

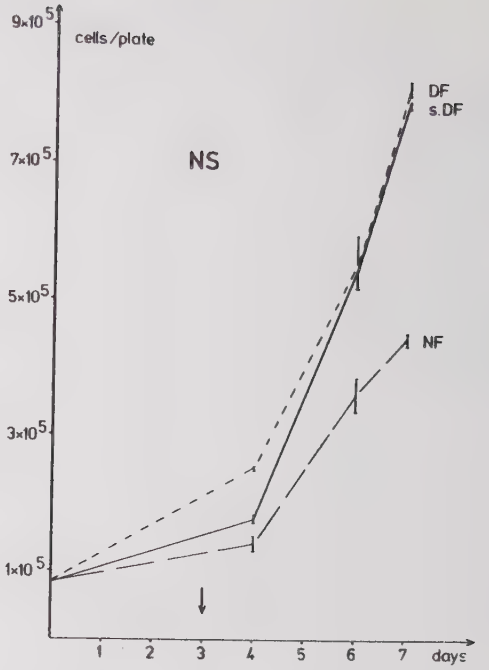



Abb. 10:

Fibroblastenwachstum von einem insulinbedürftigen, normgewichtigen, pankreatektomierten Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung (sDF), einem altersgleichen, nicht insulinpflichtigen, übergewichtigen, primären Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DF) und einem gleichaltrigen Stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10 % Diabetikerserum (DS)(Abb.9) bzw. 10 % Normalserum (NS) (Abb.10).

↓=Wechsel des Inkubationsmediums; I Mittelwert ± SEM

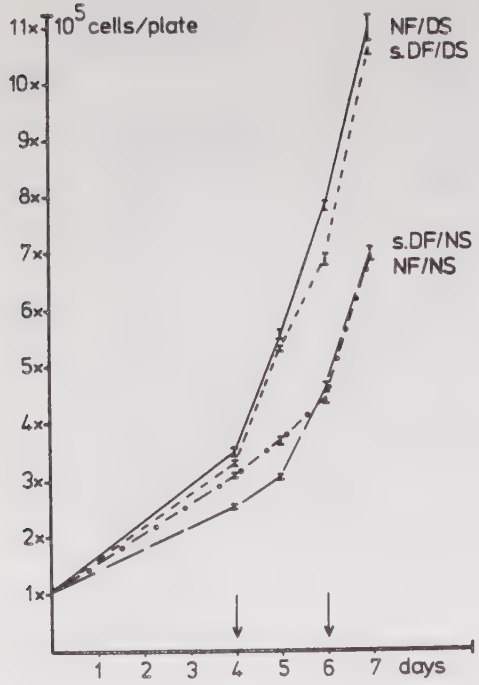



Abb. 11:
Fibroblastenwachstum eines normgewichtigen, insulinbehandelten pankreatektomierten Diabetikers mit optimaler Stoffwechseleinstellung seit Pankreatektomie (sDF) und eines gleichaltrigen Stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10 % Diabetiker- (DS) bzw. Normalserum (NS).

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

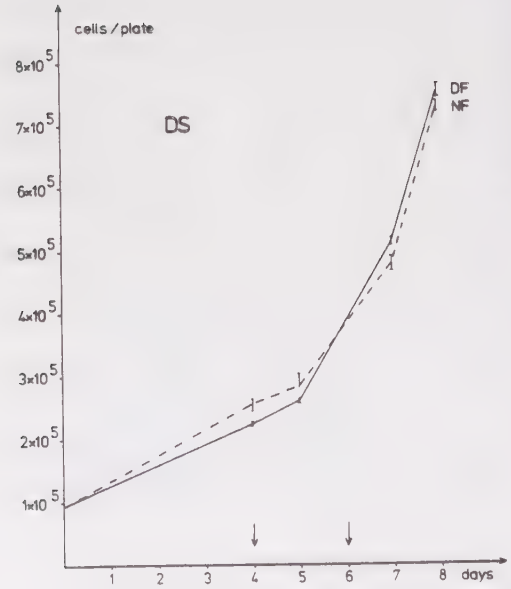



Abb. 12:
Fibroblastenwachstum eines normgewichtigen, nicht insulinbedürftigen Diabetikers mit optimaler Stoffwechseleinstellung seit Erstmanifestation (DF) und eines gleichaltrigen Stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10 % Diabetikerserum (DS).

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

### 3.1.1.2. Zellulär fixierte Wachstumseigenschaften in Fibroblasten von Patienten mit verschiedenen Formen primärer Hyperlipoproteinämien

Das Wachstum gezüchteter Fibroblasten von Patienten mit verschiedenen Formen primärer Hyperlipoproteinämien mit familiärer Hyperlipoproteinämiebelastung, deren Lipoproteinstoffwechsel mindestens über 6-19 Jahre seit der Diagnose und vermutlich noch deutlich länger gestört und auch durch die Therapie nicht normalisiert worden war, ist im Vergleich zum Fibroblastenwachstum Stoffwechselgesunder (NF) der gleichen Altersgruppe typenspezifisch unterschiedlich um 9-83 % vermindert, wie aus repräsentativen Wachstumskurven hervorgeht (Abb. 13-17). Dabei ist das Wachstum am meisten von Fibroblasten von einem Patienten mit homozygoter familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie (HFH) sowohl mit Serum von Stoffwechselgesunden (NS) um durchschnittlich 83 % als auch mit Serum von primären Hypercholesterinämikern (HS) um durchschnittlich 69 % gegenüber den NF vermindert (Abb. 13). Die Wachstumsrate der HFH kann aber durch wachstumssteigernde Faktoren, wie z.B. HS, deutlich erhöht werden (Abb. 13), so daß keine Wachstumsstarre vorliegt.

Das Fibroblastenwachstum von einem Patienten mit familiärer Hyperlipoproteinämie Typ III nach Fredrickson ist mit NS auf ca. die Hälfte im Vergleich zu NF vermindert (Abb. 14). Das Fibroblastenwachstum von 2 Patienten familiärer Hypertriglyceridämie (HTg-F ) ist mit NS zwar ebenfalls vermindert, bei Erreichen der Konfluenz beträgt der Unterschied der HTg-F- zur NF-Zahl aber nur noch durchschnittlich -9 % (Abb. 15). Das Fibroblastenwachstum von einem Patienten mit familiärer Hyper-$\alpha$-Cholesterinämie ist mit NS um durchschnittlich 1/3 im Vergleich zu NF vermindert (Abb. 16). Das Fibroblastenwachstum von einem Patienten mit familiärer kombinierter Hyper-$\alpha$+ß-Cholesterinämie ist mit NS um ca. 44 % und mit HS um ca. 28 % im Vergleich zu NF reduziert (Abb. 17a).

Dagegen ist das Fibroblastenwachstum des 11-jährigen Jungen mit einer kombinierten Hyper-$\alpha$+ß-Cholesterinämie in der 3. Generation (Patient Nr. 8: Tab. 6a), dessen Stoffwechselstörung erst 1 Jahr vor der Biopsieentnahme im Rahmen einer gezielten Familienuntersuchung erkannt worden war, ohne daß andere klinische Symptome auf das Vorliegen einer Stoffwechselerkrankung bzw. angiopathischer Veränderungen hinwiesen, sogar um 10-15 % im Vergleich zu Fibroblasten eines Stoffwechselgesunden der gleichen Altersgruppe gesteigert (Abb. 17b).

Proteingehalt und Zellzahl bzw. DNS-Gehalt/Platte korrelieren bei den verschiedenen Hyperlipämikerfibroblasten in linearer Weise wie bei den Fibroblasten Stoffwechselgesunder (Abb. 18 + 19).

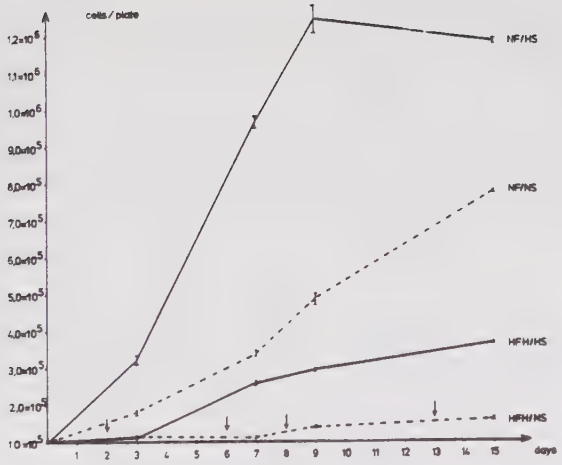



Abb. 13:
Fibroblastenwachstum eines homozygoten Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie (HFH) und eines gleichaltrigen Stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10 % Hypercholesterinämiker- (HS) bzw. Normalserum (NS).

↓= Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

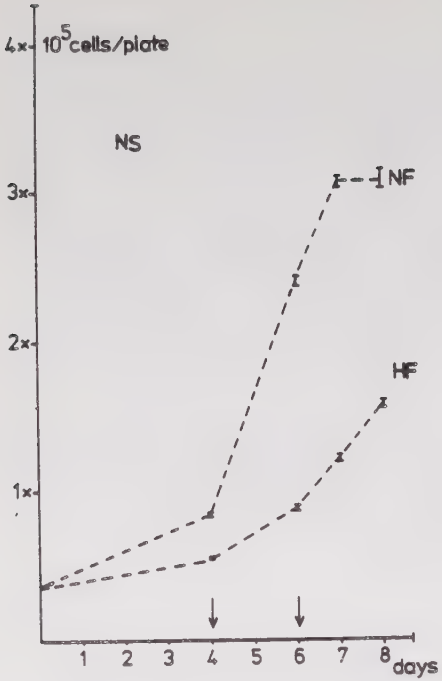



Abb. 14:
Fibroblastenwachstum eines Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie und -triglyceridämie (Typ III nach Fredrickson) (HF) und eines gleichaltrigen Stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10 % Normalserum (NS).

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

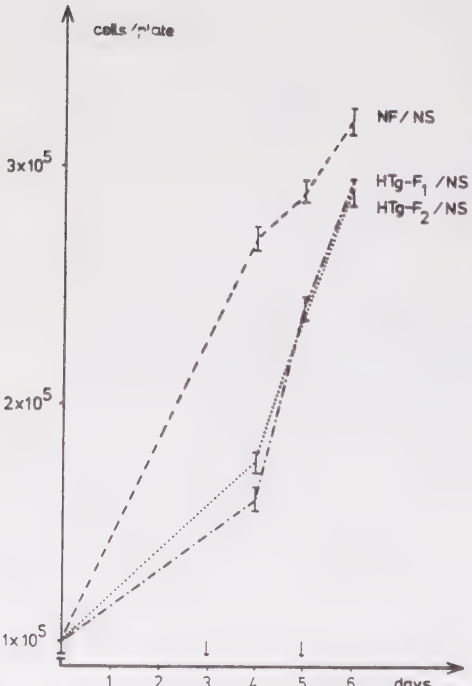



Abb. 15:
Fibroblastenwachstum zweier Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie (HTg-F) und eines gleichaltrigen Stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10 % Normalserum (NS)

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

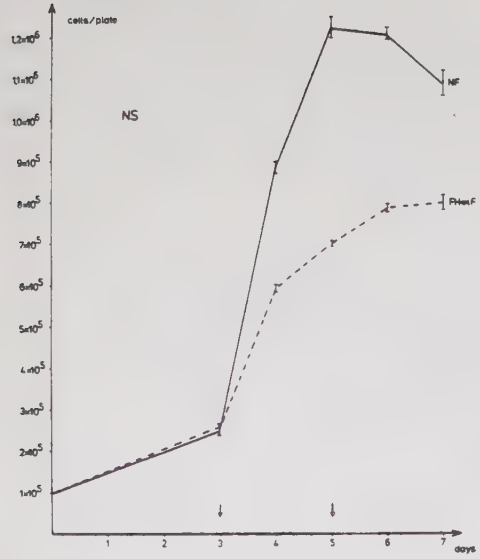



Abb. 16:
Fibroblastenwachstum eines Patienten mit familiärer Hyper-α-Cholesterinämie (FHα-F) und eines gleichaltrigen Stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10 % Normalserum (NS)

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

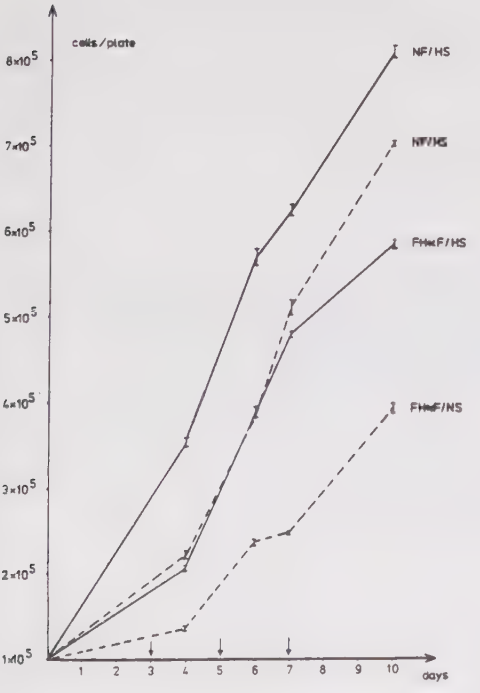



Abb. 17a:
Fibroblastenwachstum eines Patienten mit familiärer kombinierter Hyper-α + ß-Cholesterinämie (FHαF) + eines gleichaltrigen Stoffwechselgesunden (NF) in DME + 10 % Hypercholesterinämiker-(HS) bzw. Normalserum (NS)

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

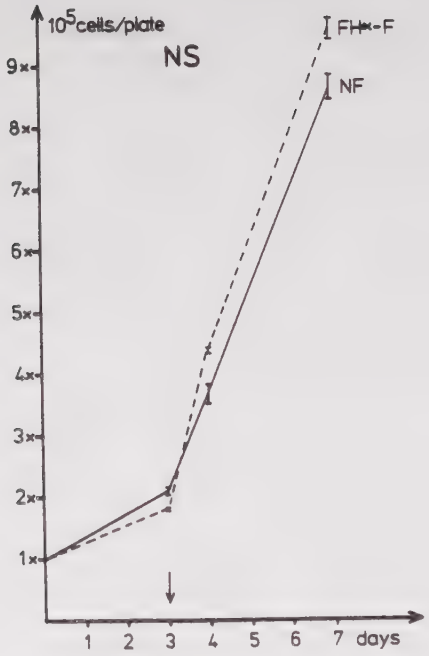



Abb. 17 b:
Fibroblastenwachstum eines 11-jährigen Patienten mit familiärer kombinierter Hyper-α+β-Cholesterinämie (FHα F), dessen Stoffwechselstörung erst 1 Jahr vor der Biopsieentnahme erkannt worden war, im Vergleich zu dem eines Stoffwechselgesunden der gleichen Altersgruppe (NF) in DME + 10% Normalserum (NS)

↓=Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

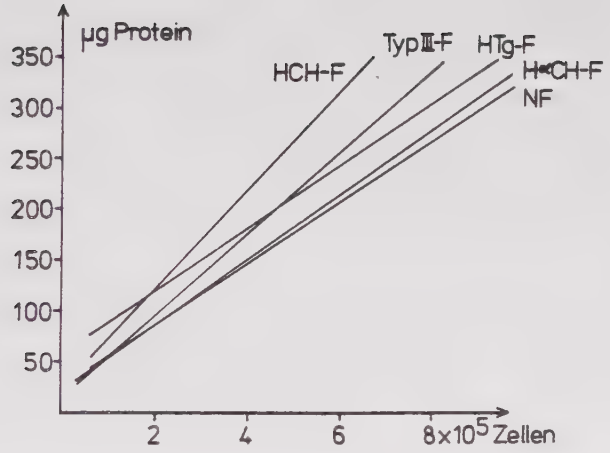



Abb. 18
Korrelation des Proteingehaltes zur Zellzahl von Fibroblasten Stoffwechselgesunder (NF; y =29,8x + 24,0 , r = 0,95 , n = 94 , p < 0,001),von homozygoten Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie (HCH-F; y = 48,2x + 21,9 ; r = 0,92 , n = 10, p< 0,001 ), mit familiärer Typ III-Hyperlipoproteinämie (Typ III-F; y =39x + 12,2 , r = 0,98 , n =20 , p < 0,001), mit familiärer Hypertriglyceridämie (HTg-F; y =30,8x + 53,4 , r = 0,87 , n = 46 , p< 0,001 ) und mit familiärer Hyper-∝-Cholesterinämie (H∝CH-F; y = 31,8x + 20,8 , r = 0,94 , n = 65 , p < 0,001 )

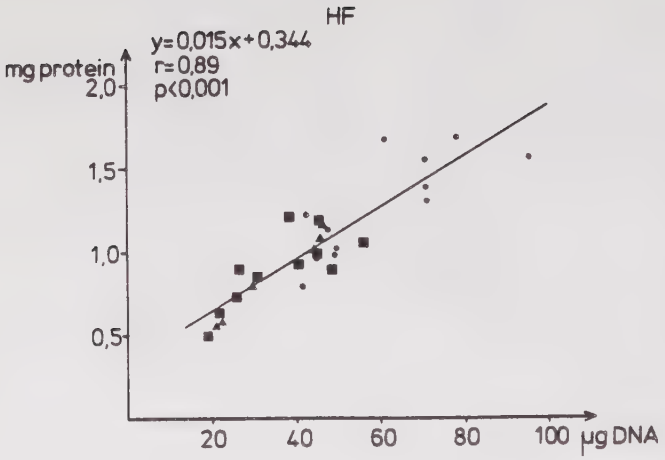



Abb. 19:
Korrelation des Proteingehaltes zum DNS-Gehalt von Fibroblasten von Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämie (HF: ● Hyper-ß-Cholesterinämie, ▲ Typ III-Hyperlipoproteinämie, ■ Hyper-α-Cholesterinämie)

### 3.1.2. Lipoproteinrezeptoren in Fibroblasten von Patienten mit primärem Diabetes, mit homozygot familiärer Hypercholesterinämie und von Stoffwechselgesunden sowie in arteriellen glatten Muskelzellen von Stoffwechselgesunden und vom Schwein .

In Fibroblasten von Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF) ist der LDL-Stoffwechsel (LDL-Bindung an die Zelloberfläche, intrazelluläre LDL-Aufnahme und -Abbau) dem in Fibroblasten von Stoffwechselgesunden (NF) und von einem Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie vergleichbar (Abb. 20, 21, 40). Der LDL-Stoffwechsel pro Zelle ist aber in allen Fibroblastenlinien abhängig von der Zelldichte. Er ist am höchsten während der logarithmischen Wachstumsphase mit niedrigem Proteingehalt/Platte und nimmt mit zunehmender Zelldichte kontinuierlich bis zur Konfluenz ab (Abb. 21).

Fibroblasten von homozygoten Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie (HCH-F) fehlt ein spezifischer LDL-Rezeptor. Der LDL-Rezeptordefekt wird deutlich in der fehlenden Wirkung von Änderungen der LDL-Konzentration (10 % Serum im Vergleich zu 5 % LDS über 24 h), von Cholesterin bzw. 7-Ketocholesterin (Tab. 9, 10) und von proteolytischen Fermenten wie z.B. Pronase im Inkubationsmedium auf die LDL-Bindung dieser Zellen (Abb. 26).

Der HDL-Stoffwechsel unterscheidet sich ebenfalls nicht zwischen DF und NF, aber auch nicht gegenüber HCH-F (Tab. 9, 11). und nimmt auch mit zunehmender Zelldichte bis zur Konfluenz ab (Abb. 22). Bei vergleichbarer Bindung von LDL und HDL an die Zelloberfläche (200 µg/mg Zellprotein) werden in DF wie in NF nur etwa 10 % der HDL intrazellulär aufgenommen (Abb. 21, 22).

LDL und HDL verringern gegenseitig und konzentrationsabhängig ihre Bindung an die Zelloberfläche von NF (Abb. 23) und DF (Abb. 42) bis auf 50 % und von arteriellen glatten Muskelzellen vom Schwein bis auf 30 % der Kontrollwerte und parallel dazu die nachfolgende intrazelluläre Metabolisierung dieser Lipoproteine (Aufnahme und Abbau) (Abb. 24).

Trotzdem unterscheiden sich die LDL- und HDL-Bindungsorte an der Fibroblastenoberfläche von Stoffwechselgesunden grundsätzlich in mehrfacher Weise: Die spezifische LDL-Rezeptorsynthese ist

1) genetisch getrennt von der Syntheseinformation für den HDL-Bindungsort kodiert, da ihr vollständiges Fehlen bei der homozygoten, familiären Hypercholesterinämie ohne Änderung der HDL-Bindung vererbbar ist (Tab. 9 - 11), und wird
2) im Gegensatz zum HDL-Bindungsort durch Sterole reguliert.

NF, die in 10 % lipoproteinhaltigem Serum gezüchtet wurden, binden LDL nicht mit hoher Affinität. Dagegen ist 18-24 h nach Lipoproteinentfernung im Inkubationsmedium durch einen Wechsel zu 5 % lipoproteinfreiem Serum (LDS) ein deutlicher Anstieg der spezifischen LDL-Bindung ohne Änderung der HDL-Bindung nachweisbar. Ein vergleichbarer Anstieg von spezifischer LDL-Bindung findet sich dagegen nicht in LDL-rezeptordefekten Fibroblasten von HCH (Tab. 9). Gleichzeitige Zugabe von 7-Ketocholesterin und Cholesterin wie von Cycloheximid zu 5 %LDS verhindert vollständig einen Anstieg der spezifischen LDL-Bindung nach 18 - 24 h ohne Effekt auf die HDL-Bindung (Tab. 9). Cholesterin wie 7-Ketocholesterin allein oder in Kombination senken nach 24 h die spezifische LDL-Bindung in NF, aber nicht in HCH-F um 55 bis 80 % ohne vergleichbare Auswirkung auf die HDL-Bindung in diesen Zellinien (Tab. 10, 11). Dabei vermindern diese Sterole die LDL-Bindung über einen weiten Bereich von

LDL-Konzentrationen im extrazellulären Medium (Abb. 25).

3. Proteolytische Enzyme, wie z.B. Pronase (1,5 µg/ml DME, 23 Min., 37°C), Subtilopeptidase A (0,1 µg/ml, 10 Min., 37°C) oder Trypsin (1 µg/ml, 10 Min., 37°C) vermindern die Bindung von $^{125}$J-LDL (1 - 20 µg/ml) an NF um 72 - 91 %, während die HDL-Bindung dadurch weder in NF noch in HCH-F wesentlich beeinflußt wird. In einem repräsentativen Beispiel (Abb. 26) wurde mit 5 µg $^{125}$J-LDL/ml bzw. 5 µg $^{125}$J-HDL/ml in DME + 5 % LDS über 2 h bei 0°C die LDL-Bindung an NF durch Vorinkubation mit Pronase um 82 % verringert, die HDL-Bindung blieb unbeeinflußt.

   In gleicher Weise kann auch die LDL-Bindung an arterielle glatte Muskelzellen verschiedener Spezies durch Proteasen reduziert werden. In einem repräsentativen Beispiel mit arteriellen glatten Muskelzellen vom Schwein bzw. von einem Stoffwechselgesunden verminderte Pronase (3 µg/ml DME, 25 Min., 37°C) die nachfolgende Bindung von $^{125}$J-LDL (5 bzw. 20 µg/ml) in DME + 5 % LDS über 2 h bei 0°C um 43 bzw. 48 % (Abb. 27). Falls nach Proteasenexposition erneut in einem proteasenfreien Zellkulturmedium (DME + 5 % LDS) inkubiert wird, ist die ursprüngliche LDL-Bindungsfähigkeit der arteriellen glatten Muskelzellen beider Spezies nach 6 h bei 37°C wieder erreicht. Dieser Vorgang kann während dieser Zeit durch Cyloheximid (210 µg/ml) oder durch Cholesterin (50 µg/ml) entweder völlig verhindert bzw. deutlich verzögert werden (Abb. 27).

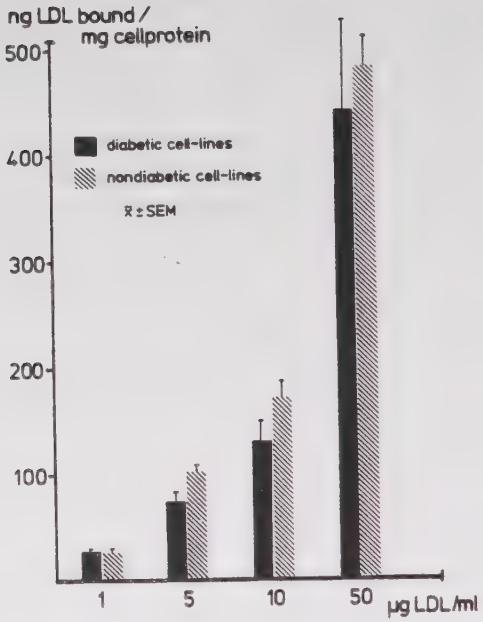



Abb. 20:
Vergleich der LDL-Bindung an die Zelloberfläche von Fibroblasten von 5 Diabetikern mit der an gleich konfluente Fibroblasten von 5 Kontrollpersonen nach Inkubation mit 4 verschiedenen $^{125}$J-LDL-Konzentrationen in DME + 5 % LDS über 4 h bei 37 °C.

Mittelwert ± SEM

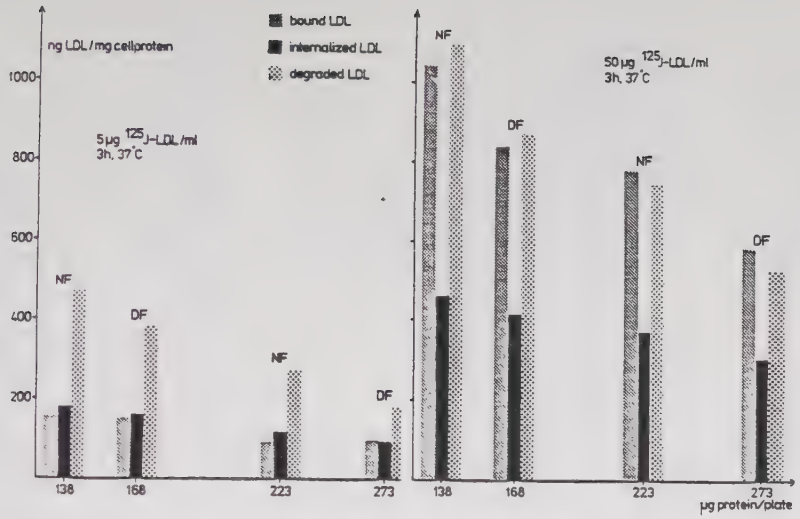



Abb. 21:
Effekt der Zelldichte (µg Zellprotein/28 $cm^2$ Platte) von normalen menschlichen Fibroblasten (NF) und Diabetikerfibroblasten (DF) auf deren Oberflächenbindung, intrazelluläre Aufnahme und den Abbau von LDL/mg Zellprotein nach Inkubation mit 5 bzw. 50 µg $^{125}$J-LDL/ml in DME + 5 % LDS über 3 h bei 37°C.

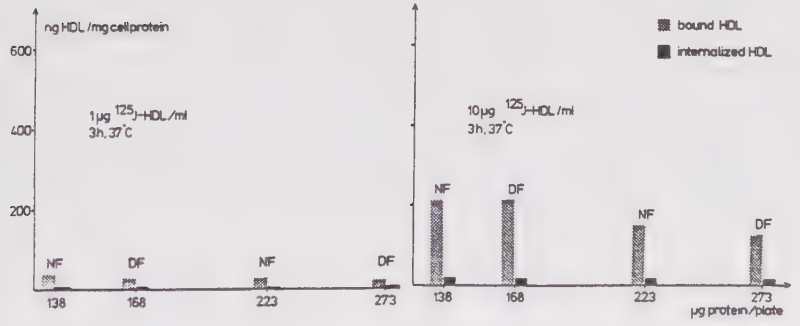



Abb. 22:
Effekt der Zelldichte (µg Zellprotein/28 $cm^2$ Platte) von normalen menschlichen Fibroblasten (NF) und Diabetikerfibroblasten (DF) auf deren Oberflächenbindung und intrazelluläre Aufnahme von HDL/mg Zellprotein nach Inkubation mit 1 bzw. 10 µg $^{125}$J-HDL/ml in DME + 5 % LDS über 3 h bei 37°C.

Tabelle 9

Effekt von lipoproteinfreiem Inkubationsmedium (LDS) (24 h bei 37°C) auf die nachfolgende LDL- und HDL-Bindung ( 2 h bei 0°C ) an Fibroblasten von 1 Stoffwechselgesunden (NF) und von 2 Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie (HCH-F)
Mittelwerte von 2- bzw. 3-fach Bestimmungen

| | Inkubation vor Messung der Lipoproteinbindung | Lipoproteinbindung (ng/mg Zellprotein) an | | |
|---|---|---|---|---|
| | | NF | HCH-$F_1$ | HCH-$F_2$ |
| $^{125}J$ - LDL (5 µg/ml) | Keine LDS (Kontrolle) | 21,0 | 7,2 | 7,2 |
| | 24 h in 5 % LDS | 66,0 | 10,8 | 10,2 |
| | 24 h in 5 % LDS + 7-Ketocholesterin (2,5 µg/ml) + Cholesterin (12,5 µg/ml) | 13,2 | 7.7 | 11,4 |
| | 24 h in 5 % LDS + Cycloheximid (210 µg/ml) | 23,1 | - | 6,4 |
| $^{125}J$ - HDL (5 µg/ml) | Keine LDS (Kontrolle | 5,7 | 5,7 | 6,4 |
| | 24 h in 5 % LDS | 5,1 | 5,8 | 6,5 |
| | 24 h in 5 % LDS + 7-Ketocholesterin (2,5 µg/ml) | 4,4 | 5,2 | 6,2 |

Tabelle 10

Steroleffekte auf die LDL-Bindung (2 h bei $0^{o}C$) an Fibroblasten von 1 Stoffwechselgesunden (NF) und von 2 Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie (HCH-F) nach vorangegangener Zellinkubation in DME + 5 % LDS über 18 - 24 h bei $37^{o}C$

| Exp. | Inkubationsbedingungen | | | NF | | $HCH\text{-}F_1$ | | $HCH\text{-}F_2$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $^{125}J$-LDL (µg/ml) | Zeit (h) | Sterolzusatz | LDL-Bindung (ng/mg Zellprotein) | Sterol-Effekt (%) | LDL-Bindung (ng/mg) | Sterol-Effekt (%) | LDL-Bindung (ng/mg) | Sterol-Effekt (%) |
| A | 5 | 24 | Kein | 58 | | 17 | | 21 | |
| | 5 | 24 | Cholesterin (50µg/ml) | 23 | -60 | 20 | +18 | 23 | +10 |
| | 5 | 24 | 7-Keto-cholesterin (2,5µg/ml) | 14 | -76 | 15 | -12 | 21 | 0 |
| B | 5 | 48 | kein | 41 | | 14 | | 29 | |
| | 5 | 48 | 7-Keto-cholesterin (2,5µg/ml) | 21 | -49 | 12 | -12 | 18 | -38 |
| C | 5 | 24 | kein | 20 | | 9 | | 10 | |
| | 5 | 24 | 7-Keto-cholesterin (2,5 µg/ml) | 9 | -55 | 9 | 0 | 9 | -10 |
| D | 10 | 38 | kein | 58 | | 34 | | - | |
| | 10 | 38 | 7-Keto-cholesterin (2,5µg/ml)+ Cholesterin( 12,5µg/ml) | 19 | -67 | 37 | +8 | - | |

Tabelle 11

Steroleffekte auf die HDL-Bindung (2 h bei $0^{\circ}C$) an Fibroblasten von 1 Stoffwechselgesunden (NF) und von 2 Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie (HCH-F) nach vorangegangener Zellinkubation in DME + 5 % LDS über 16 - 24 h bei $37^{\circ}C$.

| Exp. | Inkubationsbedingungen | | | NF | | $HCH\text{-}F_1$ | | $HCH\text{-}F_2$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $^{125}J$-HDL (µg/ml) | Zeit h | Sterolzusatz | HDL-Bindung (ng/mg Zellprotein) | Sterol-Effekt (%) | HDL-Bindung (ng/mg) | Sterol-Effekt (4) | HDL-Bindung (ng/mg) | Sterol-Effekt (%) |
| A | 5 | 24 | kein | 11,0 | | 18,0 | | 25,3 | |
| | 5 | 24 | Cholesterin (50µg/ml) | 14,8 | +34 | 17,5 | -3 | 22,5 | -11 |
| | 5 | 24 | 7-Keto-Cholesterin (2,5µg/ml) | 9,9 | -10 | 21,4 | +20 | 24,8 | - 2 |
| D | 10 | 16 | kein | 30,3 | | 60,1 | | - | |
| | 10 | 16 | 7-Keto-Cholesterin (2,5µg/ml) + Cholesterin(12,5 µg/ml) | 31,1 | + 3 | 47,5 | -21 | - | |
| E | 5 | 24 | kein | 2,2 | | 2,0 | | 2,0 | |
| | 5 | 24 | 7-Keto-Cholesterin (2,5µg/ml) + Cholesterin(12,5 µg/ml) | 2,3 | + 5 | 2,5 | +25 | 2,4 | +20 |

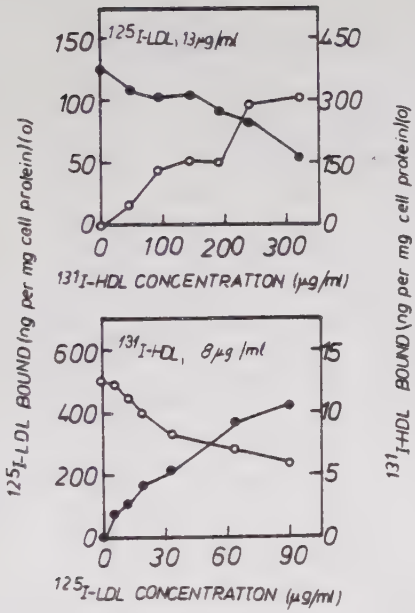



Abb. 23:
Wechselseitige Änderungen der Bindung von $^{125}$J-LDL ( ● ) und $^{131}$J-HDL ( o ) an normale menschliche Fibroblasten im Zusammenhang mit Änderungen des $^{125}$J-LDL: $^{131}$J-HDL-Verhältnisses in DME + 5 % LDS nach 3 h bei 0°C.

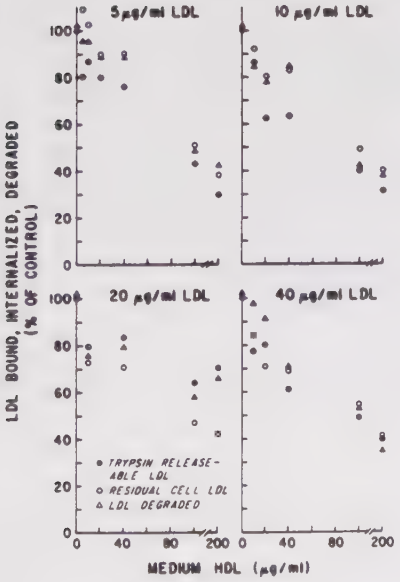



Abb. 24:
Prozentuale Verringerung der Oberflächenbindungen ( ● ), der intrazellulären Aufnahme ( o ) und des Abbaus ( △ ) von 4 verschiedenen Konzentrationen homologer $^{125}$J-LDL in arteriellen glatten Muskelzellen vom Schwein durch steigende Konzentrationen homologer HDL in DME + 5 % LDS nach 6 h bei 37°C.

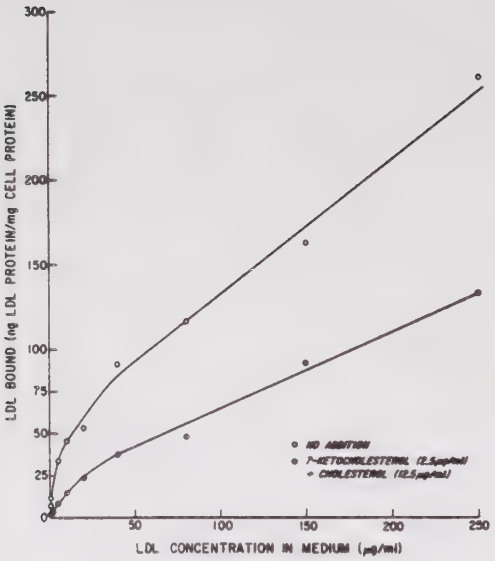



Abb. 25:

Vergleich der LDL-Oberflächenbindung an normale menschliche Fibroblasten gleicher Konfluenz mit $^{125}$J-LDL (0,1-250 µg/ml, 2 h bei 0°C) nach Vorinkubation über 19 h in DME + 5 % LDS mit ( ● ) und ohne ( o ) Zugabe von 7-Ketocholesterin (2,5 µg/ml) + Cholesterin (12,5 µg/ml)

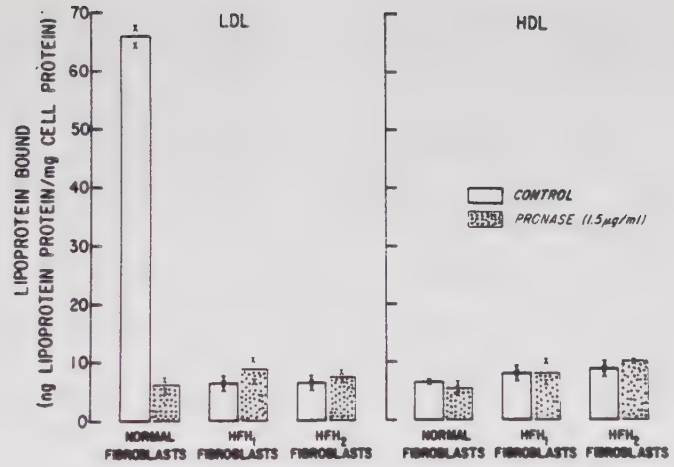



Abb. 26:
Effekt von Pronase (1,5 µg/ml DME über 23 Min. bei 37°C) auf die nachfolgende Oberflächenbindung von $^{125}$J-LDL (5 µg/ml) oder $^{125}$J-HDL (5 µg/ml) in DME + 5 % LDS über 2 h bei 0°C an Fibroblasten von einem Stoffwechselgesunden und 2 homozygoten Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie (HFH).

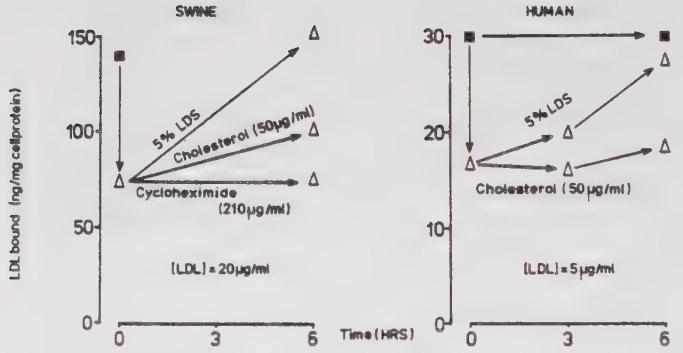



Abb. 27:
Effekt von Pronase (3 µg/ml DME über 25 Min. bei 37°C) (▲) auf die Oberflächenbindung von $^{125}$J-LDL (5 bzw. 20 ug/ml DME + 5 % LDS über 2 h bei 0°C) und der Effekt von Cholesterin (50 µg/ml) bzw. Cycloheximid (210 µg/ml) auf die nachfolgende Erholungsphase der LDL-Bindung (6 h bei 37°C) an arterielle glatte Muskelzellen vom Schwein und von einem Stoffwechselgesunden im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (■)

### 3.1.3. Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidase in Fibroblasten von Stoffwechselgesunden, Diabetikern und Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien sowie in arteriellen glatten Muskelzellen von Stoffwechselgesunden

Die Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasenaktivität pro µg DNS waren bei vergleichbarer Zelldichte in Fibroblasten von Stoffwechselgesunden (NF) und Diabetikern (DF) nicht unterschiedlich (Abb. 28 a-c; Tab. 14, 15). Dabei stieg die Cathepsin D-Aktivität pro µg DNS in allen NF und DF mit zunehmender Zelldichte an. Aus Abb. 28a ergibt sich, daß dieser Anstieg der Cathepsin D-Aktivität/µg DNS erst ab einer Zelldichte von etwa 20 µg DNS/78,5 $cm^2$ deutlich wird. Die Cathepsin B- und Aminopeptidasenaktivität/78,5 $cm^2$ stieg in allen NF und DF mit zunehmender Zelldichte linear an (Abb. 28b, 28 c), wobei die Cathepsin B- und Aminopeptidasenaktivität pro µg DNS im Gegensatz zur Cathepsin D-Aktivität unabhängig von der Zelldichte praktisch konstant blieb.

Dagegen war die Cathepsin D-Aktivität pro µg DNS in den verschiedenen Hyperlipämikerfibroblasten im Paarvergleich zu parallel unter gleichen Bedingungen untersuchten Fibroblasten von Stoffwechselgesunden in unterschiedlichem Ausmaß erniedrigt: In Fibroblasten von 3 Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie um durchschnittlich 12-31 % (Tab. 21), in Fibroblasten von 2 Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie um durchschnittlich 16 - 19 %, in Fibroblasten von 4 Patienten mit familiärer Hyper-$\alpha$-Lipoproteinämie um durchschnittlich 14 - 20 %, dagegen in Fibroblasten von Patienten mit familiärer Hyperlipoproteinämie Typ III nach Fredrickson nur um durchschnittlich 6 - 8 % (Abb. 29 a-f; Tab. 22).

Die Cathepsin B-Aktivität pro µg DNS war ebenfalls in den verschiedenen Fibroblastenlinien von Patienten mit familiärer Hyperlipoproteinämie im Paarvergleich zu parallel unter gleichen Bedingungen untersuchten Fibroblasten Stoffwechselgesunder um durchschnittlich 9 - 14 % erniedrigt (Abb. 29 c-d; Tab. 21, 22). Die Aminopeptidasenaktivität pro µg DNS unterschied sich unter diesen Bedingungen nicht zwischen den verschiedenen Hyperlipämiker- und Kontrollfibroblasten (Abb. 29 e; Tab. 22).

Die Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasenaktivität/ 78,5 $cm^2$ stieg in allen Fibroblastenlinien von Patienten mit familiären Hyperlipoproteinämien mit zunehmender Zelldichte im Bereich zwischen 12 - 19 µg DNS/78,5 $cm^2$ linear an (Abb. 29 a-f), wobei die Proteasenaktivität pro µg DNS in diesem Bereich praktisch konstant blieben.

Im Vergleich zu 2 humanen arteriellen glatten Muskelzelllinien war die Cathepsin D-Aktivität pro µg DNS in Fibroblasten von 6 Stoffwechselgesunden um etwa das Dreifache, die Cathepsin B-Aktivität um etwa das Drei- bis Vierfache und die Aminopeptidasenaktivität sogar um das Zehnfache höher (Abb. 30; Tab. 25).

Abb. 28a

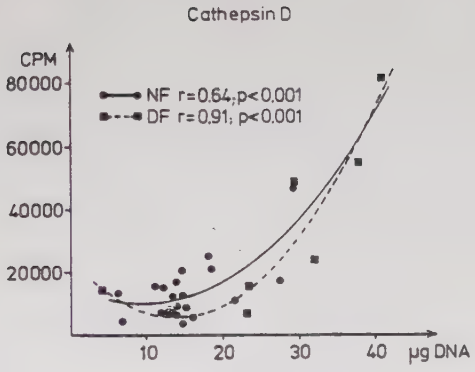



Abb. 28b

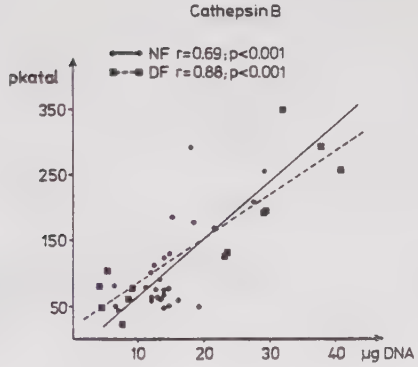



Abb. 28c

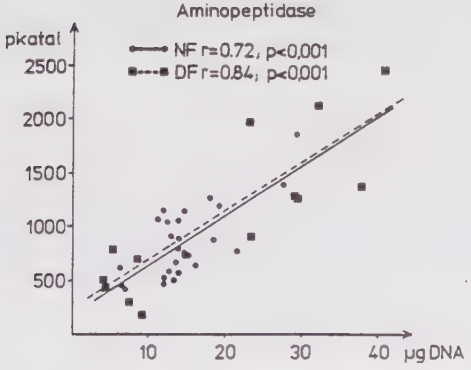



Abb. 28 a-c:
Korrelation der a) Cathepsin D-, b) Cathepsin B- und c) Aminopeptidasenaktivität zum DNS-Gehalt (Bereich: 5-40 ug DNS) von Fibroblasten (gezüchtet mit Normalserum) von 5 Stoffwechselgesunden (NF: ● ) und 4 Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF: ■).
a) $yNF = 66x^2-1286x+16057$, $yDF = 97x^2-2698x+24188$; b) $yNF = 9x-22$, $yDF = 7x+19$; c) $yNF = 46x+182$, $yDF = 46x+216$

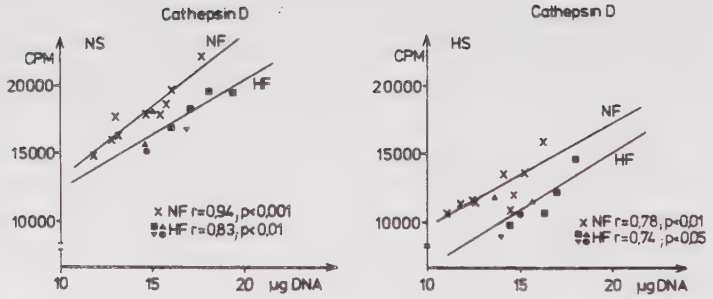



Abb. 29 a+b:
Korrelation der Cathepsin D-Aktivität zum DNS-Gehalt (Bereich: 10-20 µg DNS) von Fibroblasten, gezüchtet mit Normalserum (NS) bzw. Hypercholesterinämikerserum (HS), von 9 Stoffwechselgesunden (NF:x) und 11 Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämie (HF: ● Hyper-ß-Cholesterinämie, ▲ Typ III-Hyperlipoproteinämie, ▼ Hypertriglyceridämie, ■ Hyper ∝ Cholesterinämie)
a) yNF=1055x+2657, yHF=803x+4346, b) yNF=771x+1912, yHF=838x-1730

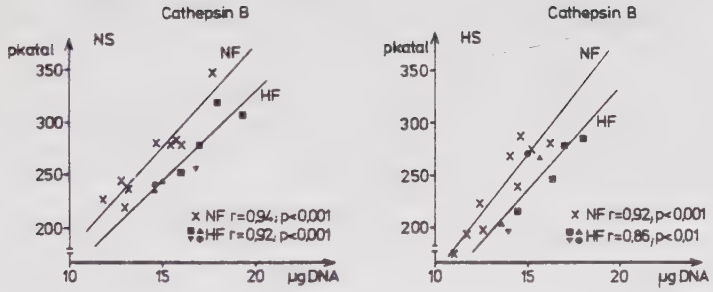



Abb. 29 c+d:
Korrelation der Cathepsin B-Aktivität zum DNS-Gehalt (Bereich: 10-20 µg DNS) von Fibroblasten gezüchtet mit Normalserum (NS) bzw. Hypercholesterinämikerserum (HS) von 9 Stoffwechselgesunden (NF:x) und 11 Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämie (HF: ● Hyper-ß-Cholesterinämie, ▲ Typ III-Hyperlipoproteinämie, ▼ Hypertriglyceridämie, ■ Hyper ∝ Cholesterinämie)
c) yNF=19,5x-16, yHF=16,9x-10; d) yNF=22,7x-70, yHF=19,8x-62;

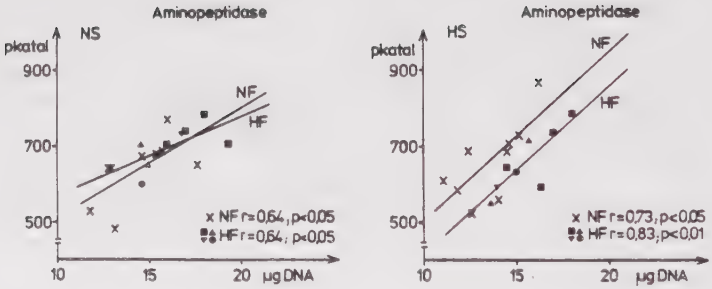



Abb. 29 e + f:
Korrelation der Aminopeptidasen-Aktivität zum DNS-Gehalt (Bereich: 10-20 µg DNS) von Fibroblasten, gezüchtet mit Normalserum (NS) bzw. Hypercholesterinämikerserum (HS), von 9 Stoffwechselgesunden (NF:x) und 11 Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämie (HF: ● Hyper-ß-Cholesterinämie, ▲ Typ III-Hyperlipoproteinämie, ▼ Hypertriglyceridämie, ■ Hyper∝Cholesterinämie)
e) yNF=29x+224, yHF=21x+357; f) yNF=44,5x+58, yHF=44+32

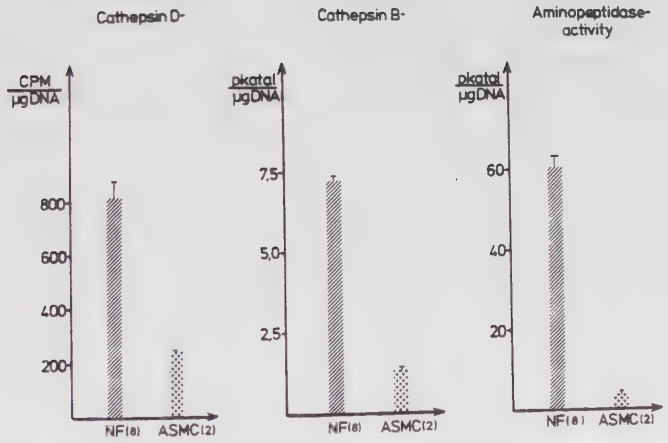



Abb.30:
Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität in Fibroblasten von 8 Stoffwechselgesunden (NF) und arteriellen glatten Muskelzellen von 2 Stoffwechselgesunden (ASMC)

### 3.2.1.1. Effekte des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung auf das Fibroblastenwachstum von Diabetikern und Stoffwechselgesunden sowie von arteriellen glatten Muskelzellen

Im Vergleich zu 14 Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS, Tab. 1) stimulierten 12 Mischseren von Patienten mit einem nicht insulinbedürftigen, nicht ketotischen Typ II-Diabetes, deren Stoffwechsel schlecht eingestellt war (DS, Tab. 1), über 6 - 10 Tage bis zum Erreichen der Konfluenz das Fibroblastenwachstum von 6 Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung zusätzlich um 8 - 53 % (Mittelwert 26 %, $p < 0{,}001$) (Abb. 31a), von 5 pankreatektomierten Diabetikern zusätzlich um 6 - 64 % (Mittelwert 36 %, $p < 0{,}05$) (Abb. 31b) und von 4 Stoffwechselgesunden zusätzlich um 3 - 58 % (Mittelwert 25 %, $p < 0{,}01$) (Abb. 31c).

Der zusätzliche wachstumssteigernde Effekt dieser DS kann sich während aller Wachstumsphasen bei mesenchymalen Zellen unterschiedlichen Ursprungs auswirken, wie an repräsentativen Wachstumskurven von Diabetiker- (Abb. 32), Hypertriglyceridämiker- (Abb. 33) und Normalfibroblasten (Abb. 34) sowie von menschlichen arteriellen glatten Muskelzellen (Abb. 35) nachweisbar ist.

Parallel dazu steigen auch der Proteingehalt und der $^{14}$C-Leucin-Proteineinbau/Platte (Abb. 32). Während der logarithmischen Wachstumsphase mit DS ist auch der 3-H-Thymidineinbau/Platte deutlich gesteigert, der sich in der stationären Wachstumsphase bei Konfluenz normalisiert (Abb. 32). Dabei verändert die Inkubation in DS nicht die lineare Korrelation zwischen Protein- bzw. DNS-Gehalt und Zellzahl/Platte, wie sie bereits für NS in Abb. 4 und 5 dargestellt wurden.

Mischserum von insulinbedürftigen Diabetikern zeigt eine vergleichbare zusätzliche Stimulation des Fibroblastenwachstums wie Seren von nicht-insulinpflichtigen Diabetikern. Da aber die Wirkung von Insulinantikörpern auf den Zellstoffwechsel im Einzelnen noch unbekannt ist, sie den Zellstoffwechsel z.B. durch Freisetzung von unbekannten Insulinmengen beeinflussen und geringe Mengen von Insulinantikörpern der Bestimmung entgehen könnten, wurden nur Seren von nicht insulinbedürftigen Diabetikern ohne Insulinantikörper in ihrer Wirkung auf den Zellstoffwechsel untersucht.

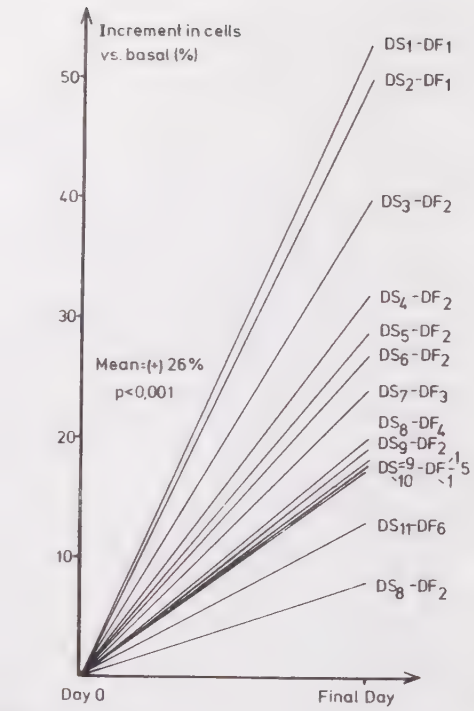
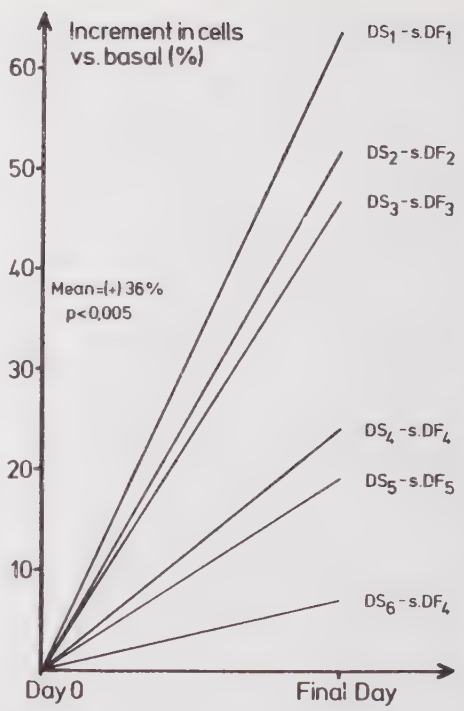
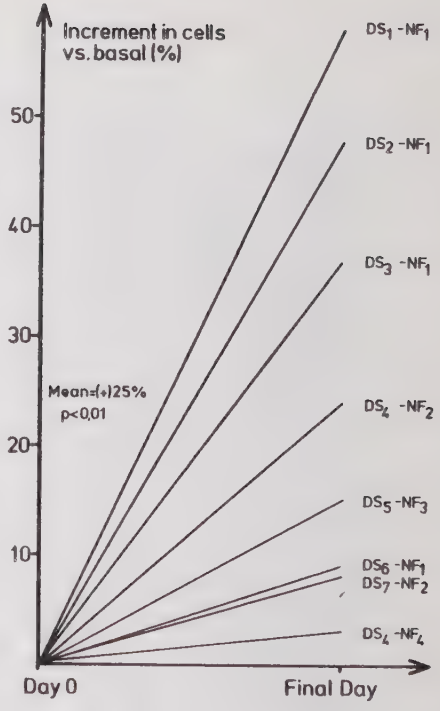



Abb. 31 a




Ább. 31 b




'Abb. 31 c

Wachstumseffekte von 11 Mischseren nicht insulinbedürftiger Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) auf den zusätzlichen prozentualen Anstieg der Fibroblastenzahl von 6 Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF) (Abb. 31a), von 5 pankreatektomierten Diabetikern (sDF) (Abb. 31b) und von 4 Stoffwechselgesunden (NF)(Abb. 31c)im Vergleich zu den parallel mit Normalserum (n=11) 6-10 Tage gewachsenen gleichen Fibroblasten.

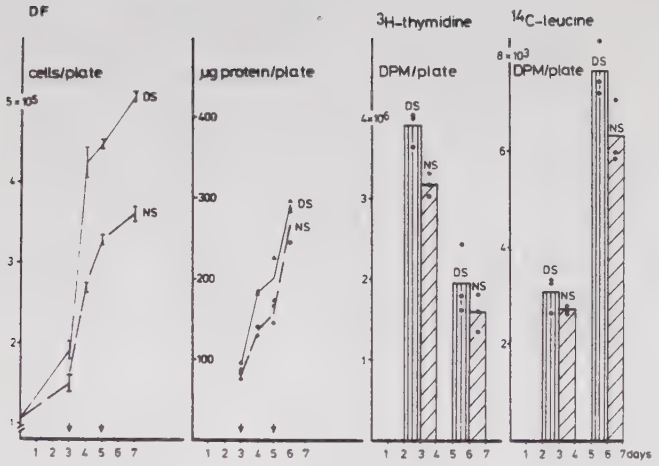



Abb. 32:
Vergleich der Serumwirkungen von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) und von Stoffwechselgesunden (NS) auf Wachstum, Proteingehalt (µg/Platte), $^{3}H$-Thymidin- und $^{14}C$-Leucineinbau (DPM/Platte) von Fibroblasten eines nicht insulinbedürftigen Diabetikers.

↓= Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

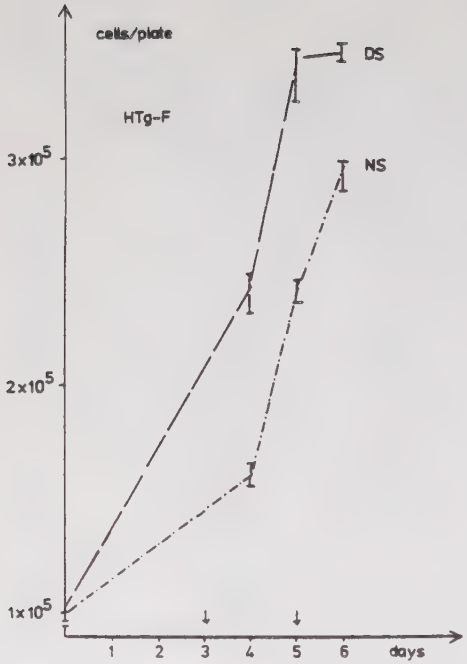



Abb. 33:
Serumeffekt von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) und von Stoffwechselgesunden (NS) auf das Fibroblastenwachstum eines Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie (HTg-F)

↓= Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

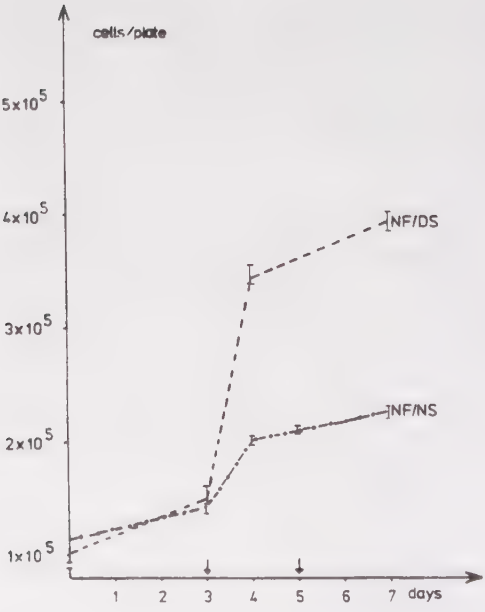



Abb. 34:
Serumeffekt von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) und von Stoffwechselgesunden (NS) auf das Fibroblastenwachstum eines Stoffwechselgesunden (NF)

↓= Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

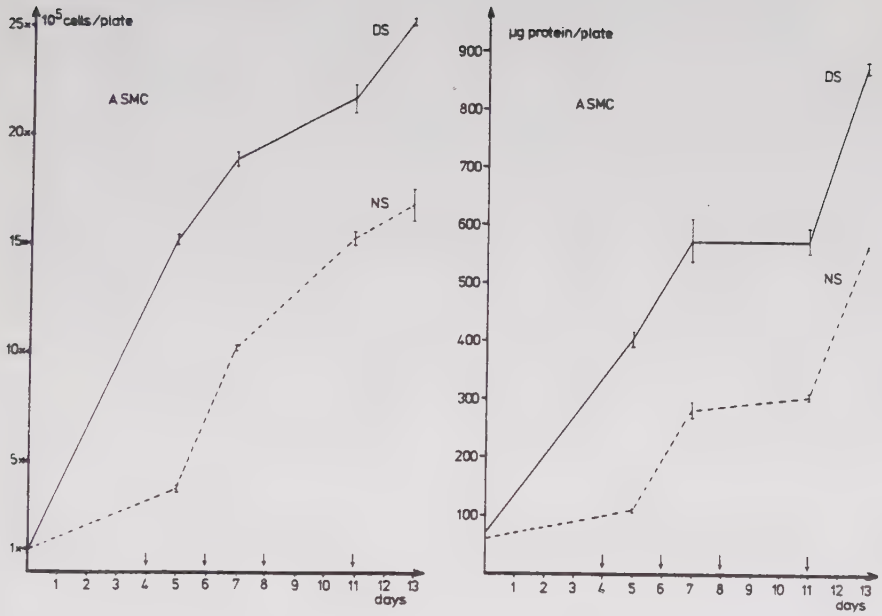



Abb. 35:
Serumeffekt von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) und von Stoffwechselgesunden (NS) auf das Wachstum und den Proteingehalt (ug/Platte) von menschlichen arteriellen glatten Muskelzellen (ASMC)

↓= Wechsel des Inkubationsmediums; I Mittelwert ± SEM

### 3.2.1.2. Effekt des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung auf die Proteinsynthese in Fibroblasten von Diabetikern und Stoffwechselgesunden

Sechs Mischseren von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) steigerten den $^{14}$C-Leucin-Proteineinbau im Vergleich zu 6 Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS) bereits nach 4 Std. um 37 % und nach 20 Std. um 40 % ($p < 0{,}025$). Der Einbau von $^{14}$C-Leucin in zellständige Proteine ist in diesen DS im Vergleich zu NS bereits nach 4 Std. um 24 % ($p < 0{,}01$) und nach 20 Std. um 33 % ($p < 0{,}0025$) gesteigert. Der Effekt von DS auf den $^{14}$C-Leucineinbau in extrazellulär abgegebene Proteine nach 4 wie nach 20 Std. unterscheidet sich dagegen nicht vom Effekt des Normalserums (Tab. 12).

Die DS steigerten im Vergleich zu den NS in ähnlicher Weise auch den Einbau von $^{14}$C-Prolin in Zellproteine nach 4 Std. um 20 % und nach 20 Std. um 36 % ($p < 0{,}025$). Dabei ist ebenfalls wie beim $^{14}$C-Leucineinbau kein Unterschied beim $^{14}$C-Proleineinbau in extrazellulär abgegebene Proteine im Vergleich zum Normalserumeffekt nachweisbar (Tab. 12).

Damit führt DS im Vergleich zu NS bereits nach 4 Std. und auch noch nach 20 Std. zu einer im Verhältnis zur Menge neu synthetisierter zellulärer Proteine deutlich verminderten Proteinabgabe aus den Fibroblasten, wie aus deren um 11 - 23 % verminderten Quotienten (Aminosäureneinbau in zelluläres/extrazelluläres Protein) hervorgeht (Tab. 13).

Da diese mit DS gezüchteten Fibroblasten im Vergleich zum Normalserumeffekt nach 4 bzw. 20 Std. eine etwa gleich große Proteinmenge extrazellulär abgeben, handelt es sich nur um eine relative Verminderung der Proteinabgabe, wie repräsentative Beispiele zum Proteineinbau von $^{14}$C-Leucin (Abb. 36a)

und $^{14}$C-Prolin (Abb. 36b) in Diabetikerfibroblasten belegen. Zusätzlich führt DS zu einer Verzögerung bei der extrazellulären Proteinabgabe (Tab. 13).

Mit zunehmender Zelldichte nimmt der Einbau von $^{14}$C-Leucin und $^{14}$C-Prolin in Protein pro Zelle nach 4 bzw. 20 Std. Inkubation bei allen untersuchten DF und NF ab (Abb. 37a und b). Dabei ist zwischen Fibroblasten von Diabetikern und von Stoffwechselgesunden unter vergleichbaren Bedingungen kein Unterschied beim Einbau von $^{14}$C-Leucin und $^{14}$C-Prolin in Zellproteine nachweisbar.

Tabelle 12:

Zusätzlicher Effekt von 6 Mischseren von Typ II-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) im Vergleich zu 6 Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS) auf den $^{14}$C-Leucin- bzw. $^{14}$C-Prolineinbau (CPM/$10^6$ Zellen) in zelluläre bzw. extrazellulär abgegebene Proteine bei Fibroblasten von Diabetikern und Stoffwechselgesunden (n=9) nach 4 bzw. 20 Stunden Inkubation mit $^{14}$C-Leucin bzw. $^{14}$C-Prolin (0,5 µCi/ml ) bei 37°C.

$\bar{x}$ + SEM; + $p < 0{,}01$; ++ $p < 0{,}025$; +++ $p < 0{,}0025$ (für den Vergleich DS zu NS)

Angegeben ist die zusätzliche Einbaurate in % bei Inkubation in DS (Einbaurate bei NS = 100 %)

| | $^{14}$C-Leucin | | $^{14}$C-Prolin | |
|---|---|---|---|---|
| | zelluläres Protein | extrazelluläres Protein | zelluläres Protein | extrazelluläres Protein |
| 4 h | $24 \pm 12^{+}$ | $13 \pm 8$ | $14 \pm 16$ | $6 \pm 12$ |
| 20 h | $33 \pm 12^{+++}$ | $7 \pm 8$ | $27 \pm 15^{++}$ | $9 \pm 10$ |

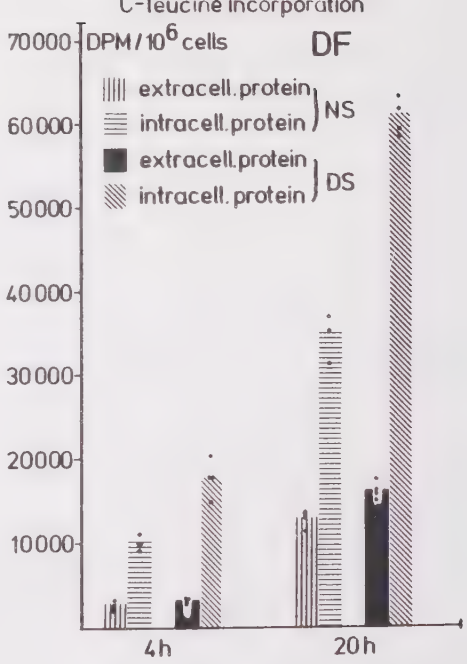
Tabelle 13:

Effekt von 6 Mischseren von Typ II-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) im Vergleich zu 6 Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS) auf das Verhältnis von $^{14}$C-Leucin- bzw. $^{14}$C-Prolineinbau (CPM/$10^6$ Zellen) in zelluläre Proteine zur extrazellulär abgegebenen Menge dieser Proteine bei Fibroblasten von Diabetikern und Stoffwechselgesunden (n=9) nach 4 bzw. 20 Stunden Inkubation mit $^{14}$C-Leucin bzw. $^{14}$C-Prolin (0,5 µCi/ml) bei 37°C.

$\bar{x} \pm$ SEM; + $p<0,05$; ++ $p<0,005$; +++ $p<0,001$ (DS/NS)

Angegeben ist der Quotient zellulärer/extrazellulärer Proteineinbau von Leucin bzw. Prolin.

| | $^{14}$C-Leucin | | $^{14}$C-Prolin | |
|---|---|---|---|---|
| | DS | NS | DS | NS |
| 4 h | 4,23±0,23$^{+}$ | 3,80±0,19 | 2,45±0,12 | 2,32±0,14 |
| 20 h | 3,45±0,15$^{+++}$ | 2,80±0,19 | 1,43±0,08$^{++}$ | 1,22±0,07 |



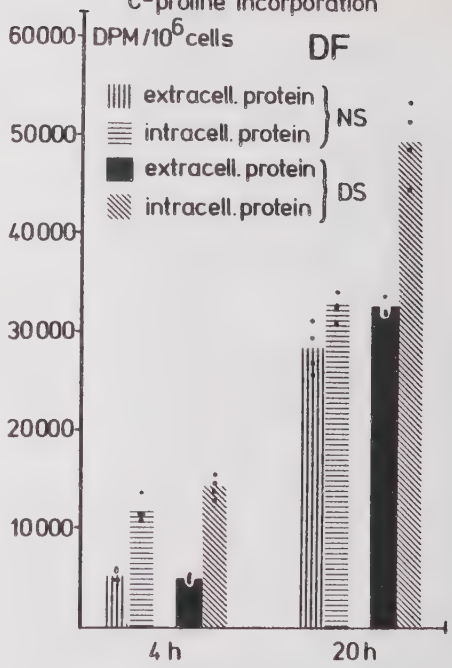
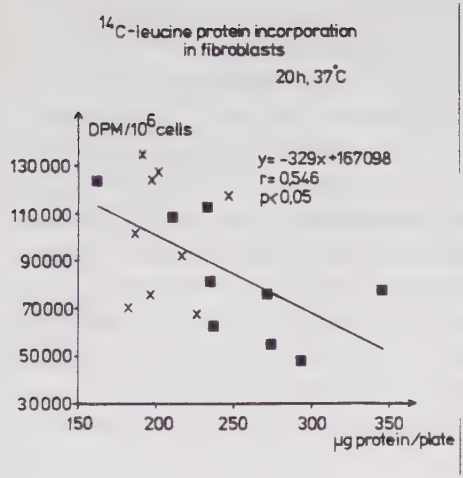




Abb. 36 a

Abb. 36 b

Einbau von $^{14}$C-Leucin (0,5 µCi/ml) (Abb. 36 a) und $^{14}$C-Prolin (0,5 µCi/ml) (Abb. 36 b) in zelluläre und extrazelluläre Proteine nach 4 und 20 h bei 37°C in Fibroblasten eines Diabetikers (DF), die parallel in DME + 10 % Serum von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) bzw. von Stoffwechselgesunden (NS) gezüchtet wurden.



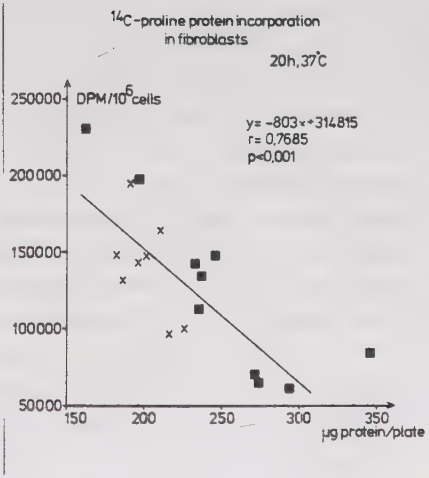




Abb. 37a

Abb. 37 b

Korrelation des Proteineinbaus von $^{14}$C-Leucin (0,5 µCi/ml) (Abb. 37a) und $^{14}$C-Prolin (0,5 µCi/ml) (Abb. 37b) nach 20 h bei 37°C in Fibroblasten von 4 Diabetikern (■) und 5 Stoffwechselgesunden (×) zum Proteingehalt (µg/Platte)

### 3.2.1.3. Effekte des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung auf den LDL- und HDL-Stoffwechsel in Fibroblasten von Diabetikern, Hypertriglyceridämikern und Stoffwechselgesunden sowie menschlichen arteriellen glatten Muskelzellen

Sechs Mischseren von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) steigerten im Bereich von 1 - 100 µg $^{125}J$-LDL/ml Inkubationsmedium die LDL-Oberflächenbindung und den nachfolgenden intrazellulären Metabolismus der LDL in allen untersuchten Fibroblastenlinien (n = 9) zelltypunabhängig bis um 160 % gegenüber den Vergleichswerten mit 6 Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS). Dies zeigen repräsentative Beispiele von Fibroblasten eines Stoffwechselgesunden (Abb. 38a), eines Diabetikers (Abb. 39a) und eines Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie (Abb. 40). Dieser Effekt von Diabetikerserum ist nicht nachweisbar, wenn Fibroblasten mit NS bis zur Konfluenz gezüchtet und erst danach für 4 Std. dem DS exponiert werden, so daß ein Kurzzeiteffekt des DS nicht vorliegt.

Bei niedrigen LDL-Konzentrationen bis zu 20 µg/ml ist die LDL-Bindung an die Zelloberfläche serumunabhängig und der begrenzende Faktor für die nachfolgende intrazelluläre Aufnahme und den Abbau der LDL, die in diesem Konzentrationsbereich auch am raschesten relativ zur gebundenen LDL-Menge erfolgen. Dies kommt in einem für beide Seren- und Zelltypen gleichen und konstant niedrigen Verhältnis von LDL-Bindung zu LDL-Metabolismus zum Ausdruck (Abb. 38b und 39b). Bei höheren LDL-Konzentrationen bis zu 100 µg/ml steigt in allen Fibroblastentypen dieses Verhältnis erwartungsgemäß an, da nach Absättigung der spezifischen LDL-Rezeptorkapazität bei zunehmender LDL-Bindung mit niedriger Affinität die intrazelluläre Aufnahme der primär begrenzende Faktor für den weiteren LDL-Abbau wird, mit der Folge, daß relativ zur Menge der an die Oberfläche gebundenen LDL weniger intrazellulär metabolisiert wird.

DS verstärkt in allen Zelltypen im Vergleich zu NS den Anstieg dieses Verhältnisses noch zusätzlich mit der Folge, daß relativ zur gebundenen LDL- Menge noch um 20-25 % weniger LDL aufgenommen und abgebaut wird als mit NS (Abb. 38b und 39b). Ein Angriffspunkt dieses Effektes von Diabetikerserum betrifft den Abbau des Proteinanteils der LDL durch Cathepsin D (Abschnitt 3.2.1.4.).

DS steigerte im Vergleich zu NS den HDL-Stoffwechsel von mesenchymalen Zellen in ähnlicher Weise und Ausmaß wie den LDL-Stoffwechsel, wie aus einem repräsentativen Beispiel an menschlichen arteriellen glatten Muskelzellen (Abb. 38a) hervorgeht. Dabei metabolisierten diese mit DS gezüchteten Zellen mit zunehmender HDL-Konzentration ebenfalls 20 - 50 % weniger von der an die zelloberfläche gebundenen HDL-Menge als mit NS gezüchtete Zellen, wie aus den unterschiedlichen linearen Korrelationen für die beiden Serumtypen hervorgeht (Abb. 41 b).

DS beeinflußt nicht wesentlich die Interaktion von LDL und HDL bei ihrer Bindung an die Zelloberfläche. 100 bzw. 500 µg HDL/ml verminderten die LDL-Bindung von 5 bzw. 50 µg $^{125}$J-LDL/ml an Diabetikerfibroblasten in gleichem Ausmaß unabhängig vom für die Zellzüchtung benutzten Serumtyp (Abb. 42).

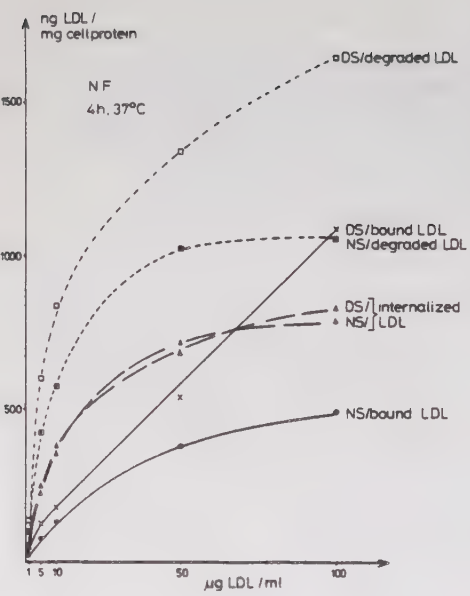



Abb. 38 a:
Effekt des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) im Vergleich zum Effekt des Serums von Stoffwechselgesunden (NS) auf die Bindung (●—●), die intrazelluläre Aufnahme (△ - - - $^{125}$J) und den Abbau (■----■) von $^{125}$J-LDL (1-100 ug/ml) in Fibroblasten eines Stoffwechselgesunden (NF) (DME + 5 % LDS, 4 h, 37°C)

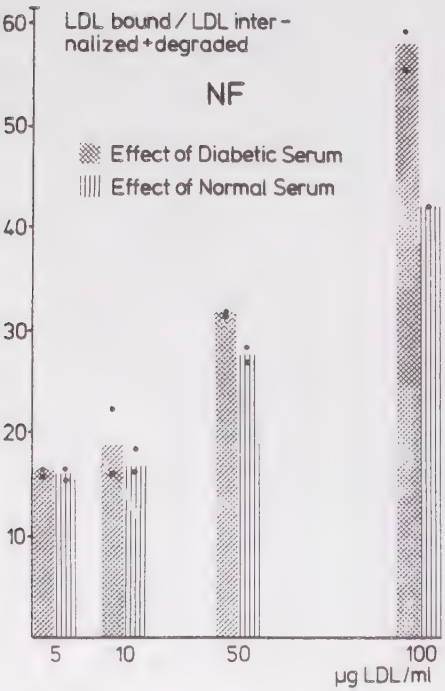



Abb. 38b:
Effekt des Serums von Diabetikern im Vergleich zu Normalserum auf das Verhältnis von zelloberflächengebundener LDL zu intrazellulär aufgenommener und abgebauter LDL in NF bei 4 verschiedenen $^{125}$J-LDL-Konzentrationen/ml Inkubationsmedium (Daten aus Versuch in Abb. 38a)

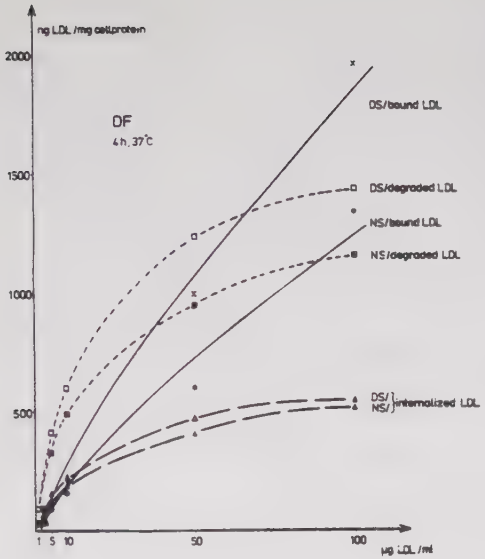



Abb. 39 a:
Effekt des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) im Vergleich zum Serumeffekt von Stoffwechselgesunden (NS) auf die Bindung (x——x), die intrazelluläre Aufnahme (Δ— —Δ) und den Abbau (□ ------ □) von $^{125}$J- LDL (1-100 µg/ml) in Fibroblasten eines Diabetikers (DF) (DME + 5 % LDS, 4 h, 37°C)

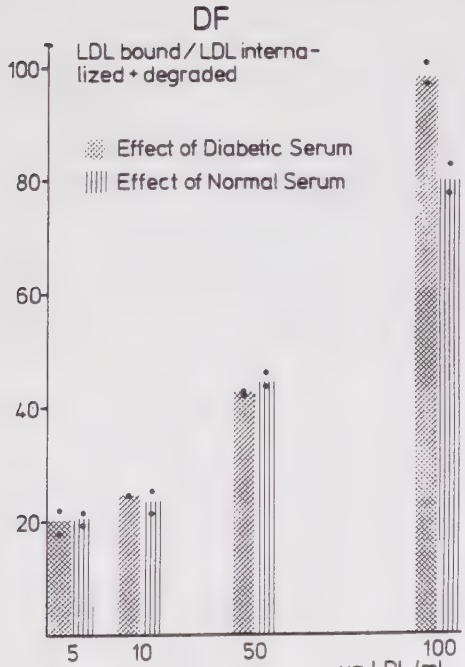



Abb. 39 b:
Effekt des Serums von Diabetikern im Vergleich zu Normalserum auf das Verhältnis von zelloberflächengebundener LDL zu intrazellulär aufgenommener und abgebauter LDL in DF bei 4 verschiedenen $^{125}$J-LDL-Konzentrationen pro ml Inkubationsmedium (Daten aus Versuch in Abb. 39 a)

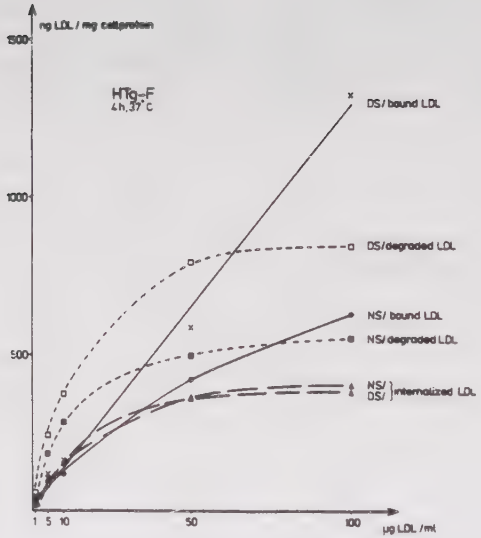



Abb. 40:
Effekt des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) im Vergleich zum Effekt des Serums von Stoffwechselgesunden (NS) auf die Bindung (x—x), die intrazelluläre Aufnahme (Δ--Δ) und den Abbau (□-----□) von $^{125}$J-LDL (1-100 µg/ml) in Fibroblasten eines Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie (HTg-F) (DME + 5 % LDS, 4 h, 37°C)

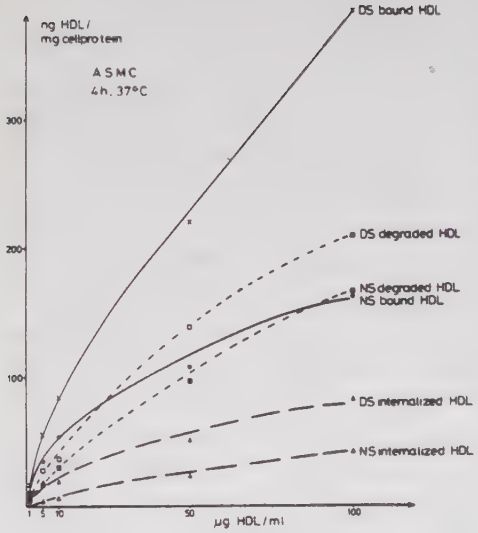



Abb. 41 a:
Effekt von Serum nicht insulinbedürftiger Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) im Vergleich zum Effekt von Serum Stoffwechselgesunder (NS) auf die Bindung (x——x), die intrazelluläre Aufnahme (▲——▲) und den Abbau von $^{125}$J-HDL(□——□) (1-100 µg/ml) in menschlichen arteriellen glatten Muskelzellen (ASMC) (DME + 5 % LDS, 4 h, 37°C)

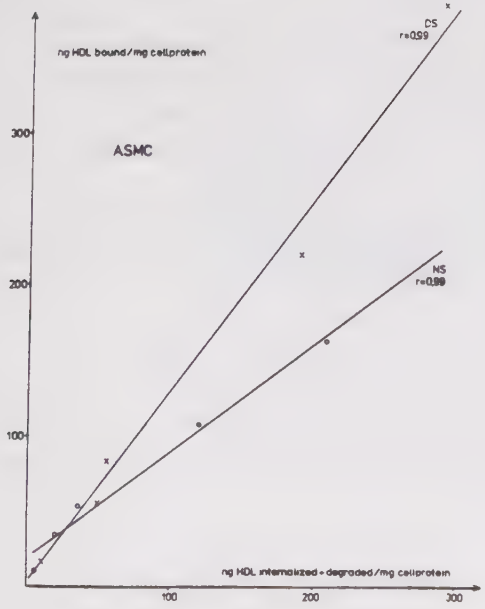



Abb. 41 b:
Effekt des Serums von Diabetikern (DSx) im Vergleich zu Normalserum (NS o) auf die Korrelation von zelloberflächengebundener HDL zu intrazellulär aufgenommener und abgebauter HDL in menschlichen arteriellen glatten Muskelzellen (ASMC) bei $^{125}$J-HDL-Konzentrationen im Bereich von 1-100 µg/ml Inkubationsmedium (Daten aus Versuch in Abb. 41 a)

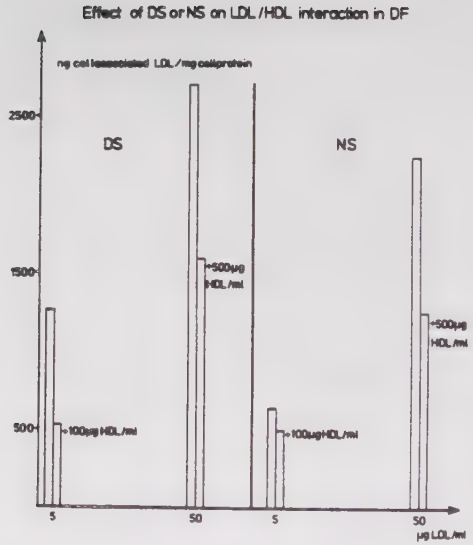



Abb. 42 :
Effekt des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) im Vergleich zum Serum von Stoffwechselgesunden (NS) auf die Menge der zellassoziierten LDL in Diabetikerfibroblasten (DF) nach Inkubation mit 5 bzw. 50 µg $^{125}$J-LDL/ml DME + 5 % LDS über 4 h bei 37 °C und auf die Verringerung dieser LDL-Menge durch gleichzeitige Zugabe von 100 bzw. 500 µg HDL/ml

### 3.2.1.4. Effekte des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung auf Proteasenaktivitäten

Cathepsin D

Fünf Mischseren von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) erniedrigten signifikant im Vergleich zu 5 Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS) die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS in Fibroblasten von 6 Stoffwechselgesunden um durchschnittlich 32 % (Tab. 14, 15a + b), von 4 Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung um durchschnittlich 31 % (Tab. 14) und von 6 pankreatektomierten Diabetikern um durchschnittlich 28 % (Tab. 15a + b).

Ein vergleichbarer Effekt von DS ist auch beim Abbau von LDL durch Cathepsin D von Fibroblasten und von arteriellen glatten Muskelzellen nachweisbar. Drei DS erniedrigten im Vergleich zu 3 NS signifikant die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS in Fibroblasten von 5 Diabetikern um durchschnittlich 28 % (Tab. 20) und in arteriellen glatten Muskelzellen von 2 Stoffwechselgesunden um durchschnittlich 16 % (Tab. 25). Dieser DS-Effekt auf den LDL-Abbau durch Cathepsin D ist bei einer Substratkonzentration von 20 µg LDL ebenso wirksam wie bei 200 µg LDL/Test (Tab. 16), die physiologischen Konzentrationen in der Gefäßwand entsprechen.

Die extrazelluläre Cathepsin D-Aktivität im Inkubationsmedium betrug durchschnittlich 20 - 37 % der intrazellulären Enzymaktivität, wobei keine serumspezifischen Unterschiede nachweisbar waren (Tab. 17). Insbesondere fand sich im extrazellulären Medium bei Verwendung von Mischseren keine zusätzliche, von den Fibroblasten abgegebene Cathepsin D-Aktivität, die in Zusammenhang mit einer entsprechenden Verminderung der intrazellulären Aktivität hätte stehen können.

Soweit die Zelldichte bei den untersuchten Fibroblasten von Stoffwechselgesunden niedriger als bei den Fibroblasten von Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung war (Tab. 14), können die Cathepsin D-Aktivitäten/µg DNS zwischen den verschiedenen Fibroblastentypen nicht unmittelbar, sondern nur bei Beachtung der unterschiedlichen Zelldichten und ihrer Auswirkungen auf die Enzymaktivität (Abb. 28a) miteinander verglichen werden.

Bei den Versuchen zum Nachweis des Serumeffektes wurden Konfluenzunterschiede innerhalb einer Zellinie zur Testzeit infolge stärkeren Wachstums in DS durch erhöhte Fibroblastenzahlen beim Ansetzen mit NS vermieden. Der Effekt des DS ist deshalb bei den einzelnen Fibroblastentypen direkt mit dem Effekt des NS vergleichbar.

Cathepsin B

Die Cathepsin B-Aktivität/µg DNS in diesen 14 Fibroblastenlinien wurden durch 5 DS nicht signifikant verändert (Tab. 14, 15a).

Extrazelluläre Cathepsin B-Aktivität im Inkubationsmedium während der Zellzüchtung in DME + 10 % des jeweiligen Serums war nicht nachweisbar.

Aminopeptidase

Fünf DS erhöhten signifikant im Vergleich zu 5 NS die Aminopeptidasenaktivität/µg DNS in Fibroblasten von 4 Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung um durchschnittlich 13 % (Tab. 14), von 5 pankreatektomierten Diabetikern um durchschnittlich 35 % (Tab. 15a) und von 6 Stoffwechselgesunden um durchschnittlich 14 % (Tab. 15a).

Die extrazelluläre Aminopeptidasenaktivität im Inkubationsmedium während der Zellzüchtung in DME + 10 % des jeweiligen Serums betrug ohne Unterschied zwischen beiden Serumtypen durchschnittlich 14 % der intrazellulären Enzymaktivität. 24 Std. nach Zugabe des Inkubationsmediums zu den Fibroblasten stieg die extrazelluläre Aminopeptidasenaktivität bei allen Fibroblastenlinien proportional zu ihrer intrazellulären Erhöhung um 8 - 23 % an (Tab. 18).

Tabelle 14

Effekt des Serums von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) (n=3) und von Stoffwechselgesunden (NS) (n=3) auf die Aktivität von Cathepsin D (CPM/ug DNS nach 60 Min.; Substrat: $^{14}$C-Hämoglobin), Cathepsin B (pkatal/ug DNS) und Aminopeptidasen (pkatal/ug DNS) in Fibroblasten von 5 Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte: 16 ± 2,2 ug DNS/78,5 cm$^2$) und von 4 Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF) (Zelldichte: 24,8 ± 3,4 ug DNS/78,5 cm$^2$
Mittelwert ± SEM; + p 0,05; ++p 0,025 (NS/DS)

| | | NS | DS |
|---|---|---|---|
| Cathepsin D | NF | 1276 ± 112 | 804 ± 80$^{+}$ |
| | DF | 1672 ± 264 | 1220 ± 208$^{++}$ |
| Cathepsin B | NF | 8,55 ± 0,56 | 8,19 ± 0,45 |
| | DF | 8,34 ± 0,86 | 9,4 ± 1,36 |
| Aminopeptidase | NF | 62,4 ± 3,2 | 65,4 ± 3,4 |
| | DF | 64,8 ± 6,2 | 73,6 ± 6,8$^{+}$ |

Tabelle 15[a]

Effekt des Serums von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) (n=3) und von Stoffwechselgesunden (NS) (n=3) auf die Aktivität von Cathepsin D (CPM/µg DNS nach 60 Min.; Substrat: $^{14}$C-Hämoglobin ), Cathepsin B (pkatal/µg DNS) und Aminopeptidasen (pkatal/µg DNS) in Fibroblasten von 6 Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte: 15,5 ± 1,0 µg DNS/78,5 cm$^2$ ) und von 6 pankreatektomierten Diabetikern (s.DF) (Zelldichte: 22,5 ± 0,7 µg DNS/ 78,5 cm$^2$)

Mittelwert ± SEM; + p<0,001 (NS/DS)

| | | NS | DS |
|---|---|---|---|
| Cathepsin D | NF | 1348 ± 42 | 972 ± 31$^+$ |
| | s.DF | 1406 ± 29 | 1007 ± 17$^+$ |
| Cathepsin B | NF | 15,3 ± 0,6 | 14,9 ± 0,4 |
| | s.DF | 14,3 ± 0,2 | 14,4 ± 0,5 |
| Aminopeptidase | NF | 45,9 ± 1,6 | 52,2 ± 1,8 $^+$ |
| | s.DF | 37,1 ± 0,9 | 49,9 ± 2,0 $^+$ |

Tabelle 15b

Effekt des Serums von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) (n=5) und von Stoffwechselgesunden (NS)(n=2) auf die Aktivität von Cathepsin D (ng LDL/µg DNS nach 60 Min.; Substrat: $^{125}$J-LDL) in Fibroblasten von 4 Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte: 15,0 ± 1,2 µg DNS/78,5 cm$^2$), von 4 pankreatektomierten Diabetikern (s.DF) (Zelldichte: 20,3 ± 4,2 µg DNS/78,5 cm$^2$) und von 2 Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF) (Zelldichte: 14,7 ± 1,2 µg DNS/78,5 cm$^2$)

Mittelwert ± SEM; + $p < 0{,}001$; ++ $p < 0{,}01$ (NS/DS)

| | NS (ng LDL/ µg DNS) | DS (ng LDL/ µg DNS) |
|---|---|---|
| NF | 283 ± 23 | 204 ± 19$^{+}$ |
| s.DF | 292 ± 30 | 221 ± 37$^{++}$ |
| DF | 310 ± 1 | 189 ± 24$^{+}$ |

Tab. 16:
Effekt eines Serums von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) und von Stoffwechselgesunden (NS) auf die Aktivität von Cathepsin D (ng LDL-Protein/µg DNS nach 60 Min.; Substratkonzentration: 20 bzw. 200 µg $^{125}$J-LDL-Protein/Test) in Fibroblasten eines Diabetikers (Zelldichte: 13,8 ± 1,0 µg DNS/78,5 $cm^2$).

| $^{125}$J-LDL (µg/Test) | NS (ng LDL-Abbau/µg DNS) | DS (ng LDL-Abbau/µg DNS) | Aktivitätsminderung durch DS |
|---|---|---|---|
| 200 | 310 | 165 | -47 % |
| 20 | 140 | 65 | -54 % |

Tabelle 17

Extra- und intrazelluläre Cathepsin D-Aktivität (CPM/78,5 $cm^2$ nach 60 Min.; Substrat: $^{14}C$-Hämoglobin) in Fibroblastenkulturen von 6 Stoffwechselgesunden (NF; 15,5 ± 1,0 µg DNS/78,5 $cm^2$) und von 6 pankreatektomierten Diabetikern (s.DF; 22,5 ± 0,7 µg DNS/78,5 $cm^2$) gezüchtet in 7 ml DME + 10 % Serum/78,5$cm^2$ von Stoffwechselgesunden (NS; n=2) und von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS; n=2).

Mittelwert ± SEM; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,001$ (NS/DS)

| | | NS | DS |
|---|---|---|---|
| DME + 10 % Serum | | 5976 ± 126 | 6090 ± 62 |
| NF | extrazellulär | 6019 ± 45 | 6133 ± 104 |
| | intrazellulär | 19172 ± 1639 | 16625 ± 1320+ |
| s.DF | extrazellulär | 6029 ± 46 | 6116 ± 55 |
| | intrazellulär | 30453 ± 1046 | 23438 ± 842++ |

Tabelle 19

Extra- und intrazelluläre Aminopeptidasenaktivität (pkatal/78,5cm$^2$) in Fibroblastenkulturen von 5 Stoffwechselgesunden (NF; 16,0 ± 2,2 µg DNS/78,5 cm$^2$), von 5 Diabetikern mit familiärer Diabetesbelastung (DF; 24,8 ± 3,4 µg DNS/78,5 cm$^2$) und von 6 pankreatektomierten Diabetikern (s.DF; 22,5 ± 0,7 µg DNS/78,5 cm$^2$) gezüchtet in 7 ml DME + 10 % Serum/78,5cm$^2$ von Stoffwechselgesunden (NS; n = 5) und von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS; n = 5).
Mittelwert ± SEM; (n) = Anzahl der Versuche
+ $p < 0{,}001$ ; ++ $p < 0{,}01$ (NS/DS)

| | | NS | DS |
|---|---|---|---|
| DME + 10 % Serum | | 153 ± 4 (8) | 156 ± 4 (8) |
| NF | extrazellulär | 166 ± 4 (8) | 186 ± 4 + (8) |
| | intrazellulär | 946 ± 56 (8) | 1068 ± 70 ++ (8) |
| DF | extrazellulär | 168 ± 8 (8) | 192 ± 6 + (8) |
| | intrazellulär | 1250 ± 138 (8) | 1362 ± 130 (8) |
| s.DF | extrazellulär | 171 ± 1 (6) | 182 ± 1 + (6) |
| | intrazellulär | 806 ± 40 (6) | 1166 ± 74 + (6) |

### 3.2.2.1. Effekte des Serum von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung auf das Wachstum von Diabetikerfibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen

Vier Mischseren von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (DS+, Tab. 1, 2) unterschieden sich während 6 Wachstumstagen bis zum konfluenten Stadium nicht in ihrer wachstumsstimulierenden Wirkung auf Diabetikerfibroblasten und menschliche arterielle glatte Muskelzellen von 4 Mischseren Stoffwechselgesunder (NS) (Tab. 19).

Im Vergleich zu 5 Mischseren von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (DS+, Tab. 2) steigerten 5 Mischseren von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS, Tab. 2) während der gesamten Wachstumszeit einschließlich des konfluenten Stadiums am 6. - 7. Tag das Wachstum einer arteriellen glatten Muskelzellinie und von 3 Diabetikerfibroblastenlinien um 15 - 42 % (Mittelwert 21 %, $p < 0{,}001$) (Abb. 43, 44).

Einzelseren von 4 nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung steigerten ebenfalls während der gesamten Wachstumszeit, einschließlich des konfluenten Stadiums am 6. - 7. Tag das Zellwachstum um 8 - 48 % (Mittelwert 29 %, $p < 0{,}001$) im Vergleich zum Effekt von Einzelseren der gleichen Diabetiker mit deutlicher Verbesserung ihrer Stoffwechsellage (Tab. 3) nach 3-5-wöchiger Behandlung (Abb. 45, 46). Diese Wachstumseffekte der verschiedenen Seren sind bei allen Zellinien nachweisbar, unabhängig von deren spezifischer Wachstumsrate, ihrem Ursprung von Diabetikern oder Stoffwechselgesunden sowie ihrem Wachstumstyp als Mono- oder Multilayer, wie z.B. bei den arteriellen glatten Muskelzellen.

Tabelle 19

Effekt des Serums von Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (DS+,Tab.2)und von Stoffwechselgesunden (NS;Tab. 2) auf das Wachstum von menschlichen arteriellen glatten Muskelzellen (ASMC) und von Fibroblasten von 3 Diabetikern (DF) Zellzahl entspricht dem Mittelwert von Dreifachzählungen von jeweils 4 Platten

| Serum | Zellinie | $10^5$ Zellen/Platte am Tag | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 0 | 5 | 6 |
| $NS_1$ | ASMC | 0,70 | 11,9 | 15,7 |
| $DS+_1$ | | 0,68 | 11,4 | 15,6 |
| $NS_2$ | $DF_2$ | 0,97 | 8,1 | 8,3 |
| $DS+_2$ | | 0,97 | 8,2 | 8,3 |
| $NS_3$ | $DF_1$ | 0,98 | 4,1 | 4,7 |
| $DS+_3$ | | 0,98 | 4,2 | 4,6 |
| $NS_4$ | $DF_3$ | 0,93 | 7,3 | 10,2 |
| $DS+_4$ | | 0,93 | 7,5 | 10,1 |

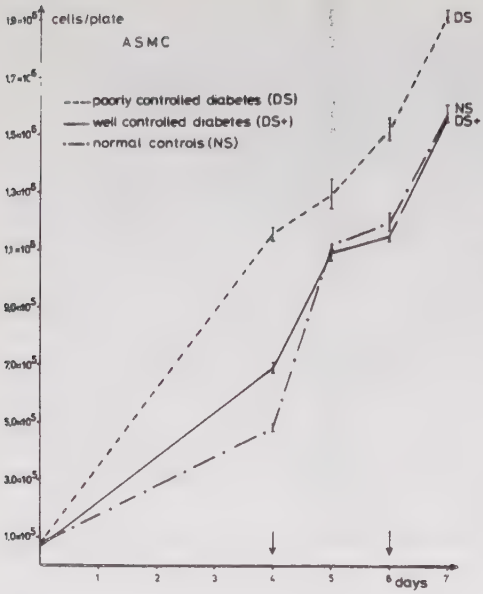



Abb. 43:
Effekte des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern tikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS-), von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (DS und von Stoffwechselgesunden (NS) auf das Wachstum menschlicher arterieller glatter Muskelzellen (ASMC)

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

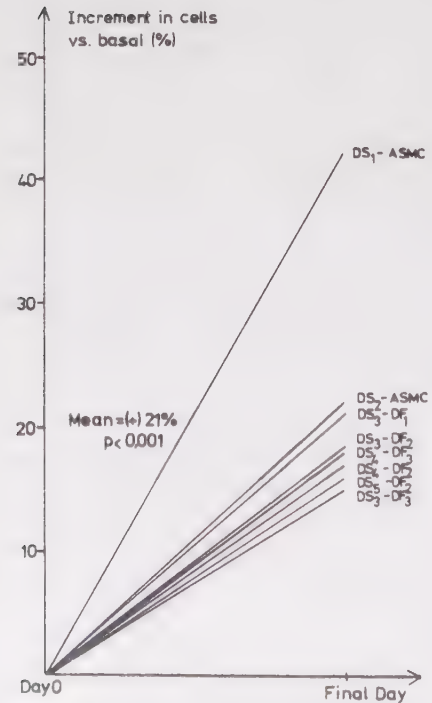



Abb. 44:
Wachstumseffekte von 5 verschiedenen Mischseren nicht insulinbedürftiger Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) auf den zusätzlichen prozentualen Anstieg der Zellzahl von 3 Diabetikerfibroblasten-Linien (DF) und von menschlichen arteriellen glatten Muskelzellen (ASMC) im Vergleich zu den parallel mit Mischserum (n=5) von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung 6-7 Tage gewachsenen gleichen Zelllinien.

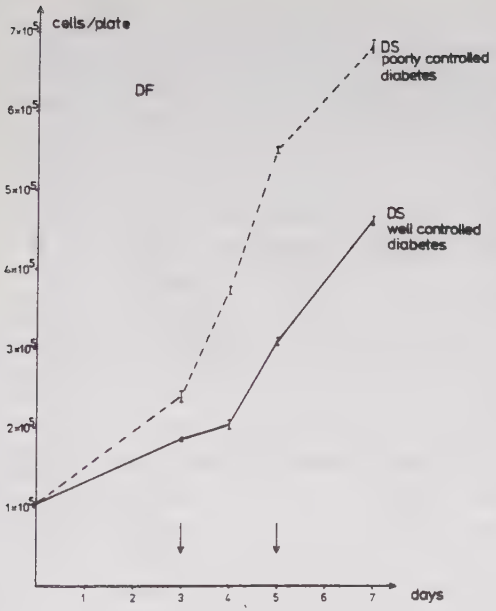



Abb. 45:
Effekt von je einem Serum eines nicht insulinbedürftigen Diabetikers mit schlechter Stoffwechseleinstellung vor und vom gleichem Patienten mit deutlicher verbesserter Stoffwechsellage nach 4-wöchiger Behandlung auf das Wachstum von Diabetikerfibroblasten (DF)

↓= Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

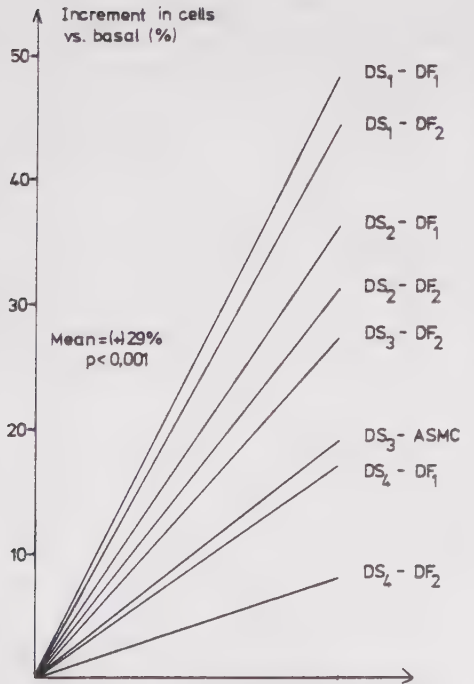



Abb. 46:
Wachstumseffekte von Einzelseren von 4 nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) (s. Tab. 3) auf den zusätzlichen prozentualen Anstieg der Zellzahl von 2 Diabetikerfibroblastenlinien (DF) und von menschlichen arteriellen glatten Muskelzellen (ASMC) im Vergleich zu den parallel mit Serum der gleichen Patienten mit deutlich verbesserter Stoffwechseleinstellung 6-7 Tage gewachsenen gleichen Zellinien

### 3.2.2.2. Effekt des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung auf die Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasenaktivität von Diabetikerfibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen

Fünf Mischseren von Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (DS+) unterschieden sich nicht von 3 Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS) in ihrer Wirkung auf die Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasenaktivität/µg DNS in Fibroblasten von 5 Diabetikern (Tab. 20). Der Effekt dieser DS+ auf die Cathepsin D- bzw. Aminopeptidasenaktivität/µg DNS war aber gleichzeitig um +31 % bzw. -9 % unterschiedlich von den bereits im Vergleich zu NS beschriebenen Wirkungen von 3 Mischseren von nicht insulinpflichtigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) (Tab. 20). Ähnlich wie bei den Fibroblasten war in 2 humanen arteriellen glatten Muskelzelllinien die Wirkung zweier DS+ auf die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS um 33 % höher im Vergleich zu 2 DS- und unterschied sich nicht von der Wirkung zweier NS. Dagegen unterschieden sich DS+, DS- und NS nicht in ihren Wirkungen auf die Cathepsin B- und Aminopeptidasenaktivität von arteriellen Muskelzellen (Tab. 25).

Tabelle 20:
Effekt des Serums von Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (DS+) (n=5), von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) (n=3) und von Stoffwechselgesunden (NS) (n=3) auf die Aktivität von Cathepsin D (ng LDL/µg DNS nach 60 Min.), Cathepsin B (pkat/µg DNS) und Aminopeptidasen (pkat/µg DNS) in Fibroblasten von 5 Diabetikern (Zelldichte: 15,3 ± 0,8 µg DNS/78,5 $cm^2$)

Mittelwert ± SEM; (n) = Anzahl der Versuche;
+ $p < 0{,}005$ (NS/DS); ++ $p < 0{,}01$ (DS/DS); +++ $p < 0{,}05$ (NS/DS)

| | NS | DS+ | DS |
|---|---|---|---|
| Cathepsin D | 315 ± 11 (5) | 298 ± 8 (5) | 228 ±22 $^{+/++}$ (5) |
| Cathepsin B | 18,6±1,1 (5) | 20,9±1,1 (5) | 19,1±1,5 (5) |
| Aminopeptidase | 49,0±1,1 (5) | 51,9±1,7 (5) | 56,9±1,8 $^{+++}$ (5) |

### 3.2.3.1. Effekte des Serums von Patienten mit Hypercholesterinämie auf das Fibroblastenwachstum von Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien und mit primärem Diabetes

Fünf Mischseren von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie vom Typ IIa nach Fredrickson (HS, Tab. 1) stimulierten im Vergleich zu 5 Mischseren Stoffwechselgesunder über 6-7 Tage bis zum Erreichen der Konfluenz das Fibroblastenwachstum von 7 Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien und von einem Diabetiker um 8-49 % (Mittelwert: 27 %, $p < 0{,}001$) (Abb. 47-49). Der zusätzliche wachstumssteigernde Effekt dieser HS kann sich ähnlich wie bei Diabetikerseren während aller Wachstumsphasen bei mesenchymalen Zellen unterschiedlichen Ursprungs auswirken, wie an repräsentativen Wachstumskurven von Hypertriglyceridämiker- (Abb. 48) und Diabetikerfibroblasten (Abb. 49) nachweisbar ist. Dabei veränderten diese HS auch nicht die lineare Korrelation zwischen Protein- bzw. DNS-Gehalt und Zellzahl/Platte, wie sie bereits für Normalseren in Abb. 18 und 19 dargestellt wurden.

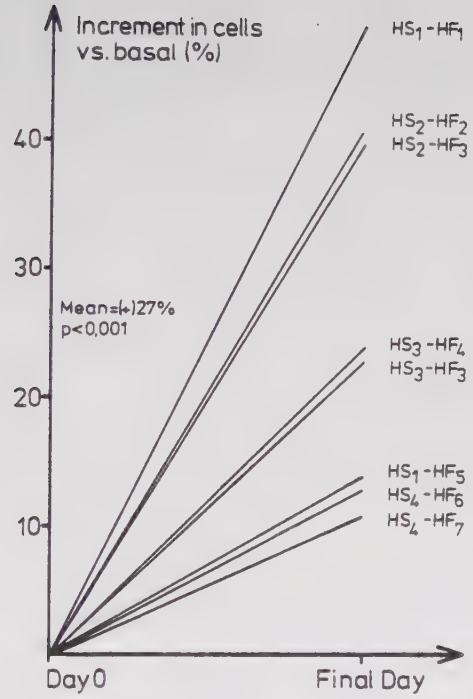



Abb. 47:
Wachstumseffekte von 4 Mischseren von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie (HS) auf den zusätzlichen prozentualen Anstieg der Fibroblastenzahl von 7 Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien (Tab. 6) im Vergleich zu den parallel mit Mischseren (n=4) von Stoffwechselgesunden 6-7 Tage gewachsenen gleichen Zellinien

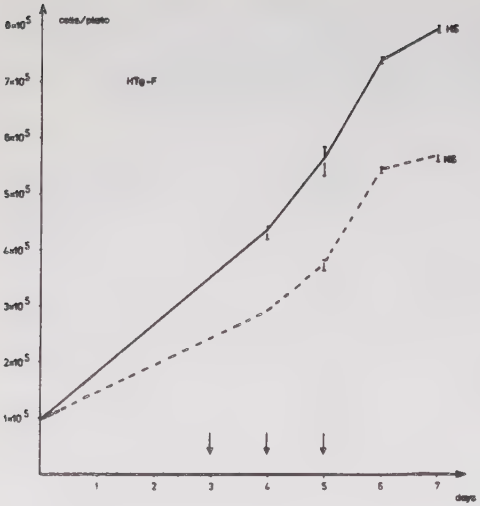



Abb. 48:
Effekt des Serums von Patienten mit Hypercholesterinämie (HS) und von Stoffwechselgesunden (NS) auf das Wachstum von Fibroblasten eines Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie (HTg-F)

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

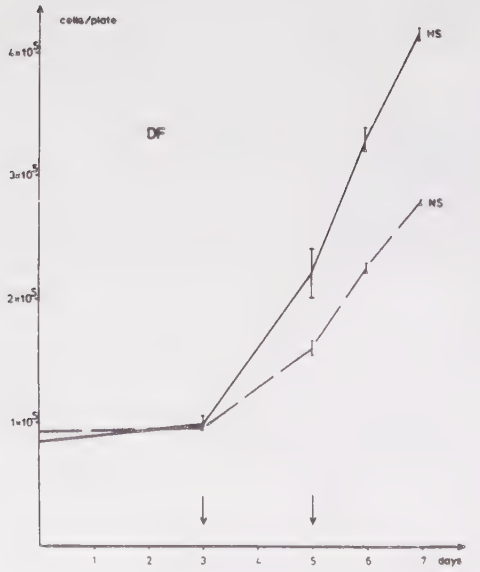



Abb. 49:
Effekt des Serums von Patienten mit Hypercholesterinämie (HS) und von Stoffwechselgesunden (NS) auf das Wachstum von Fibroblasten eines Diabetikers (DF)

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

### 3.2.3.2. Effekte des Serums von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie auf Proteasenaktivitäten in Fibroblasten von Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien und von Stoffwechselgesunden

Sechs Mischseren von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie (HS) erniedrigten signifikant im Vergleich zu 4 Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS) die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS in Fibroblasten von 9 Stoffwechselgesunden um durchschnittlich 26 % (Tab. 21, 22), von 3 Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie um durchschnittlich 44 % (Tab. 21), von 2 Patienten mit familiärer Hyperlipoproteinämie vom Typ III nach Fredrickson um durchschnittlich 25 % (Tab. 22), von 2 Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie um ca. 30 % und von 4 Patienten mit familiärer Hyper-$\alpha$-Lipoproteinämie um ca. 31 % (Tab. 22).

Ein vergleichbarer Effekt von HS ist auch beim Abbau verschiedener LDL-Konzentrationen im physiologischen Konzentrationsbereich (5 - 200 µg LDL/Test) durch Cathepsin D von Fibroblasten 7 Stoffwechselgesunder (Tab. 23 + 24), von 7 Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämie und von arteriellen glatten Muskelzellen von 2 Stoffwechselgesunden (Tab. 25) nachweisbar.

Die extrazelluläre Cathepsin D-Aktivität im Inkubationsmedium während der Zellzüchtung in DME + 10 % des jeweiligen Serums betrug 27 - 43 % der intrazellulären Enzymaktivität (Tab. 26). Dabei unterschieden sich die Cathepsin D-Aktivität der zugesetzten NS und HS nur geringfügig. Insbesondere fand sich im extrazellulären Medium bei Verwendung von HS keine zusätzliche, von den Fibroblasten abgegebene Cathepsin D-Aktivität, die im Zusammenhang mit einer entsprechenden Verminderung der intrazellulären Aktivität hätte stehen können (Tab. 26).

Cathepsin B

Die Cathepsin B-Aktivität/µg DNS in diesen 16 Fibroblastenlinien wurde durch die 6 Mischseren von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie nicht signifikant verändert (Tab. 21, 22). Extrazelluläre Cathepsin B-Aktivität war im Inkubationsmedium während der Zellzüchtung mit DME + 10 % des Serums von Patienten mit Hypercholesterinämie und von Stoffwechselgesunden nicht nachweisbar (Tab. 26).

Aminopeptidase

Die Aminopeptidase-Aktivität/µg DNS in diesen 16 Fibroblastenlinien wurde durch die 6 Mischseren von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie nicht signifikant verändert (Tab. 21, 22). Die extrazelluläre Aminopeptidasen-Aktivität im Inkubationsmedium während der Zellzüchtung in DME + 10 % des jeweiligen Serums betrug ohne Unterschied zwischen den beiden Serumtypen durchschnittlich 23 % der intrazellulären Enzymaktivität. 24 Std. nach Zugabe des Inkubationsmediums zu Fibroblasten stieg die extrazelluläre Aminopeptidasen-Aktivität bei allen Fibroblasten um durchschnittlich 9 - 14 % ($p < 0{,}001$) der Ausgangskonzentration im Inkubationsmedium an (Tab. 26).

Tabelle 21:
Effekt des Serums von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie (HS) (n=3) und von Stoffwechselgesunden (NS) (n=3) auf die Aktivität von Cathepsin D (CPM/µg DNS nach 60 Min.), Cathepsin B (pkatal/µg DNS) und Aminopeptidase (pkatal/µg DNS) in Fibroblasten von 7 Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte: 17,9 ± 1,2 µg DNS/78,5 $cm^2$) und von 3 Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie (HCH-F) (Zelldichte: 30,1 ± 2,4 µg DNS/ 78,5 $cm^2$)

Mittelwert ± SEM; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,025$ (NS/HS)

| | | NS | HS |
|---|---|---|---|
| Cathepsin D | NF | 614 ± 72 | 456 ± 63$^{+}$ |
| | HCH-F | 576 ± 152 | 316 ± 140$^{++}$ |
| Cathepsin B | NF | 5,9 ± 0,46 | 4,74 ± 0,39 |
| | HCH-F | 4,49 ± 0,71 | 4,09 ± 0,69 |
| Aminopeptidase | NF | 59,2 ± 3,0 | 51,8 ± 2,0 |
| | HCH-F | 55 ± 3,4 | 55,6 ± 3,2 |

Tabelle 22:

Effekt des Serums von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie (HS) (n = 3) und von Stoffwechselgesunden (NS) (n = 3) auf die Aktivität von Cathepsin D (CPM/µg DNS nach 60 Min.), Cathepsin B (pkatal/µg DNS) und Aminopeptidase (pkatal/µg DNS) in Fibroblasten von 9 Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte: 13,9 ± 2,2 µg DNS/78,5 $cm^2$), von 2 Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie (Typ III nach Fredrickson (Typ III-F), (Zelldichte:14,5 ± 1,1 µg DNS/78,5 $cm^2$) von 2 Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie (HTg-F) (Zelldichte: 15,1 ± 1,1 µg DNS/78,5 $cm^2$) und von 4 Patienten mit familiärer Hyper-α-Lipoproteinämie (HCH-F) (Zelldichte: 17,0 ± 1,4 µg DNS/78,5 $cm^2$)

Mittelwert ± SEM; + $p < 0,001$; ++ $p < 0,025$ (NS/HS)

| | | NS | HS |
|---|---|---|---|
| Cathepsin D | NF | 1242 ± 20 | 914 ± 26$^{+}$ |
| | Typ III-F | 1143 ± 66 | 857 ± 57$^{++}$ |
| | HTg-F | 1045 ± 27 | 736 ± 17$^{+}$ |
| | HαCH-F | 1060 ± 19 | 728 ± 31$^{+}$ |
| Cathepsin B | NF | 18,4 ± 0,3 | 17,6 ± 0,5 |
| | Typ III-F | 16,3 ± 0 | 15,9 ± 1,0 |
| | HTg-F | 15,4 ± 0,6 | 15,5 ± 1,2 |
| | HαCH-F | 16,4 ± 0,5 | 15,5 ± 0,3 |
| Aminopeptidase | NF | 44,5 ± 1,6 | 48,9 ± 1,8 |
| | Typ III-F | 45,8 ± 2,4 | 42,7 ± 2,6 |
| | HTg-F | 42,0 ± 0,8 | 41,9 ± 0,3 |
| | HαCH-F | 41,8 ± 1,7 | 41,8 ± 1,6 |

Tabelle 23:

Effekt eines Serums von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie (HS) und von Stoffwechselgesunden (NS) auf die Aktivität von Cathepsin D (ng LDL-Protein/µg DNS nach 60 Min.; Substratkonzentration von 5-200 µg $^{125}$J-LDL-Protein/Test) in Fibroblasten eines Stoffwechselgesunden (Zelldichte: 13,9 ± 3,9 µg DNS/78,5 $cm^2$).

| $^{125}$J-LDL (µg/Test) | NS (ng LDL-Abbau / µg DNS) | HS | Aktivitätsminderung durch HS |
|---|---|---|---|
| 200 | 361 | 224 | -38 % |
| 20 | 162 | 94 | -42 % |
| 10 | 123 | 82 | -33 % |
| 5 | 93 | 59 | -36 % |

Tabelle 24:

Cathepsin D-Aktivität (ng LDL-Abbau/µg DNS nach 60 Min.) in konfluenten Fibroblastenkulturen von 7 Stoffwechselgesunden (NF; Zelldichte: 14,0 ± 1,4 µg DNS/78,5 $cm^2$), von 2 Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie (HCH-F; Zelldichte 25±4,2 µg DNS/Platte ), von einem Patienten mit familiärer Hyperlipoproteinämie Typ III nach Fredrickson (Typ III-F; Zelldichte: 8,4 µg DNS/Platte ), von einem Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie (HTg-F; Zelldichte: 13,3 µg DNS/Platte ) und von einem Patienten mit familiärer Hyper-α-Lipoproteinämie (HαCH-F; Zelldichte: 13,5 µg DNS/Platte ) gezüchtet in je 7 ml DME + 10% Serum/Platte von Stoffwechselgesunden (NS; n=4) bzw. von Patienten mit primärer Hyper-ß-Cholesterinämie (HS; n=4)

$\bar{x}$ ± SEM; + $p < 0{,}001$; ++ $p < 0{,}01$ (NS/HS)

| | NS (ng LDL/µg DNS) | HS (ng LDL/µg DNS) |
|---|---|---|
| NF | 348 ± 6 | 270 ± 11$^{+}$ |
| HCH-F | 335 ± 7 | 284 ± 10$^{++}$ |
| Typ III-F | 255 ± 3 | 158 ± 6$^{+}$ |
| HTg-F | 285 ± 2 | 241 ± 7$^{++}$ |
| HαCH-F | 233 ± 2 | 182 ± 4$^{+}$ |

Tabelle 25:

Effekt des Serums von Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (DS+) (n=2), von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) (n=2), von Stoffwechselgesunden (NS) (n=2) und von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie (HS) (n=2) auf die Aktivität von Cathepsin D (ng LDL/µg DNS nach 60 Min.), Cathepsin B (pkat/µg DNS) und Aminopeptidasen (pkat/µg DNS) in Kulturen zweier arterieller glatter Muskelzell-Linien (Zelldichte: 52,9 ± 7,0 µg DNS/78,5 $cm^2$)

Mittelwerte ± SEM; + $p < 0,05$ (NS/DS) ++ $p < 0,05$ (DS+/DS), x $p < 0,001$ (NS/HS)

| | NS | DS+ | DS | HS |
|---|---|---|---|---|
| Cathepsin D | 107±2 | 120±2 | $90\pm9^{+/++}$ | $76\pm5^{x}$ |
| Cathepsin B | 2,7±0,1 | 2,5±0,1 | 2,5±0,1 | 2,5±0,1 |
| Aminopeptidase | 6,2±0,5 | 5,6±0,2 | 5,7±0,2 | 5,0±0,5 |

Tabelle 26:

Extra- und intrazelluläre Cathepsin D-Aktivität (CPM/78,5 $cm^2$ nach 60 Min.), Cathepsin B-Aktivität (pkatal/78,5 $cm^2$ ) und Aminopeptidaseaktivität (pkatal/78,5 $cm^2$) in Fibroblasten von 8 Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte: 14 ± 0,6 µg DNS/78,5 $cm^2$) und von 9 Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämie (HF; s. Tab. 6: Nr. 1, 2, 6-8, 10-13) (Zelldichte: 16 ± 0,5 µg DNS/78,5 $cm^2$) gezüchtet in 7 ml DME ± 10 % Serum/78,5 $cm^2$ von Stoffwechselgesunden (NS; n=4) und von Hypercholesterinämikern (HS; n=3)

Mittelwert ± SEM; (n) = Anzahl der Versuche; + $p < 0{,}001$ (NS/HS)

| | | NS | HS |
|---|---|---|---|
| Cathepsin D | DME + 10 % Serum | 4833 ± 45 | 5075 ± 36 |
| | NF extrazellulär | 5042 ± 52 | 5220 ± 82 |
| | NF intrazellulär | 17908 ± 955 | 12386 ± 763+ |
| | HF extrazellulär | 4946 ± 51 | 5223 ± 86 |
| | HF intrazellulär | 17592 ± 729 | 11740 ± 645+ |
| Cathepsin B | 10 % Serum | 0 | 0 |
| | NF intrazellulär | 266 ± 13 | 267 ± 1 |
| | HF intrazellulär | 240 ± 4 | 244 ± 13 |
| Aminopeptidase | DME + 10 % Serum | 156 ± 1 | 152 ± 1 |
| | NF extrazellulär | 171 ± 1 | 175 ± 1 |
| | NF intrazellulär | 640 ± 28 | 663 ± 35 |
| | HF extrazellulär | 170 ± 1 | 169 ± 1 |
| | HF intrazellulär | 704 ± 18 | 655 ± 27 |

## 3.3. Eigenschaften von Wachstumsfaktoren aus Serum von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung

Die im Serum von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) enthaltenen Wachstumsfaktoren steigern das Fibroblastenwachstum konzentrationsabhängig bei einer 7 - 20-fachen Verdünnung (Abb. 50). Eine hundertfache Verdünnung des DS vermag die Fibroblasten zwar am Leben zu erhalten, aber nicht mehr deren Wachstum zu stimulieren (Abb. 50). Dieser wachstumssteigernde Effekt bleibt auch nach Mischung zu gleichen Teilen mit Serum von Stoffwechselgesunden (NS) entsprechend dem 5 %igen DS-Anteil erhalten (Abb. 51).

Entfernt man aus DS mittels Dialyse (Seamless Cellulose Tubing 18/32) die Bestandteile mit einem Molekulargewicht $< 12.000$ Daltons, verringert sich das Fibroblastenwachstum auf das mit dialysiertem NS erreichte Ausmaß, das sich nicht signifikant vom Wachstumseffekt des NS unterscheidet (Abb. 52). Damit sind Faktoren, welche die für DS typische zusätzliche Wachstumsstimulation von menschlichen Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen hervorrufen, im wesentlichen in der niedermolekularen Serumfraktion (MG $< 12.000$ Daltons) enthalten.

Während das dialysierte DS das Fibroblastenwachstum immer noch, wenn auch in vermindertem Ausmaß zu steigern vermag, hat die niedermolekulare Fraktion (MG $< 12.000$ Daltons) aus Diabetikerserum allein keinen Wachstumseffekt mehr auf Fibroblasten. Erst nach Zugabe der höhermolekularen DS-Fraktion zur niedermolekularen DS-Fraktion wird das Fibroblastenwachstum zusätzlich stimuliert und wieder auf das mit undialysiertem DS der gleichen Charge erreichte Ausmaß gesteigert (Abb. 53). Diese zusätzliche Wachstumssteigerung durch die

niedermolekulare Fraktion aus Diabetikerserum erfolgt in gleicher Weise auch mit dialysiertem NS (MG > 12.000 Daltons). Die Ko-Faktoreigenschaft der höhermolekularen Fraktion ist insoweit diabetesunspezifisch.

Die niedermolekulare Fraktion (MG < 12.000 Daltons) aus DS behält verlustlos die wachstumsstimulierende Wirkung nach 30 Min. bei 56°C, bis zu 8 Wochen bei -20°C, nach Lyophilisation und ist stabil bei pH 1 - 12. Chloroform/Methanolextraktion (2:1) dieser DS-Fraktion führt zum Verlust der wachstumsstimulierenden Wirkung sowohl der in der organischen als auch in der wässrigen Phase enthaltenen Faktoren. Die Trennung in einen hydrophoben und hydrophilen Anteil führt aber nicht zu einer irreversiblen Veränderung der niedermolekularen Wachstumsfaktoren, da deren Rekombination den ursprünglichen Wachstumseffekt auf Fibroblasten rekonstituiert.

Insulin (MG 6.000 Daltons) steigert zwar nach Zusatz zu DME + 10 % dialysiertem DS in physiologischen Serumkonzentrationen (10 bzw. 100 µE/ml Inkubationsmedium) das Wachstum von Diabetikerfibroblasten, vermag aber trotz 30 - 50fach höherer Insulinkonzentration nicht den Wachstumseffekt von DME + 10 % DS (Insulinkonzentration 2 - 3 µE/ml Inkubationsmedium) bis zur Konfluenz nach 6 Tagen zu erreichen (Abb. 54).

Zur weiteren Festlegung des Molekulargewichtes der niedermolekularen Wachstumsfaktoren wurden mittels Dialyse (Spectrapor 6: molekulare Ausschlußgrenze 3.500 Daltons) die niedermolekularen Bestandteile entfernt. Dabei ergibt sich im Vergleich zu undialysiertem DS eine ähnliche Wachstumsverminderung von Diabetikerfibroblasten wie bei Entfernung der Bestandteile mit einem MG < 12.000 Daltons (Abb. 55). In gleicher Weise stimuliert Zugabe der herausdialysierten DS-Fraktion (Spectrapor 6) zur dialysierten DS-Fraktion (MG > 12.000 Daltons) das Fibroblastenwachstum und steigert es wieder auf das mit undialysiertem DS der gleichen Charge erreichte Ausmaß (Abb. 55).

Die Inkubation der herausdialysierten DS-Fraktion (Spectrapor 6: molekulare Ausschlußgrenze 3500 Daltons) mit Proteasen (Pronase: 0,15 - 1,5 mg/9 ml DS Äquivalent, 4 h, 25°C, pH 7,8) vermindert die wachstumsstimulierende Wirkung dieser DS-Fraktion nicht.

Entfernt man aus DS mittels Dialyse (Spectrapor 6: molekulare Ausschlußgrenze 1000 Daltons) die niedermolekularen Bestandteile, ergibt sich im Vergleich zu undialysiertem DS ebenfalls eine deutliche Wachstumsverminderung von Diabetikerfibroblasten (Abb. 56). Zugabe dieser herausdialysierten DS-Fraktion zur dialysierten DS-Fraktion (Spectrapor 6: molekulare Ausschlußgrenze 3500 Daltons) steigert das Fibroblastenwachstum in den Bereich des mit undialysiertem DS der gleichen Charge erreichte Ausmaß (Abb. 56).

Die Glukoseendkonzentration im Inkubationsmedium für die Zellkultur differierte nur um 10 - 15 mg/dl zwischen DS und NS. Gleicht man die Glukoseendkonzentration im Inkubationsmedium an, ändert das nichts an den beschriebenen Unterschieden der zellulären Wachstumsrate in Abhängigkeit vom verwendeten Serumtyp. Eine Erhöhung der Glukoseendkonzentration im Inkubationsmedium auf 400 mg/dl verringert die Wachstumsstimulation von Diabetikerfibroblasten sowohl durch DS als auch durch NS (Abb. 57).

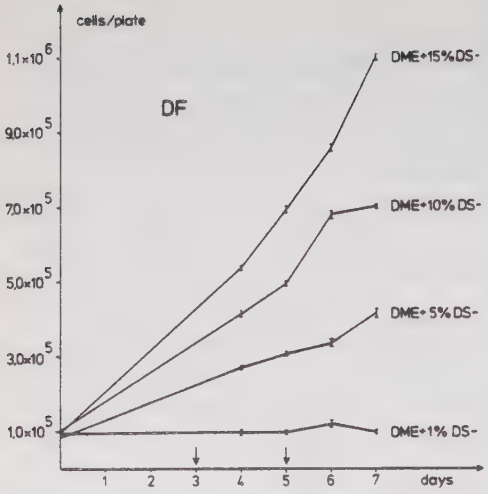



Abb. 50:
Konzentrationsabhängigkeit des wachstumssteigernden Effektes des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS ) auf Diabetikerfibroblasten (DF) in DME

↓= Wechsel des Inkubationsmedium

I Mittelwert ± SEM

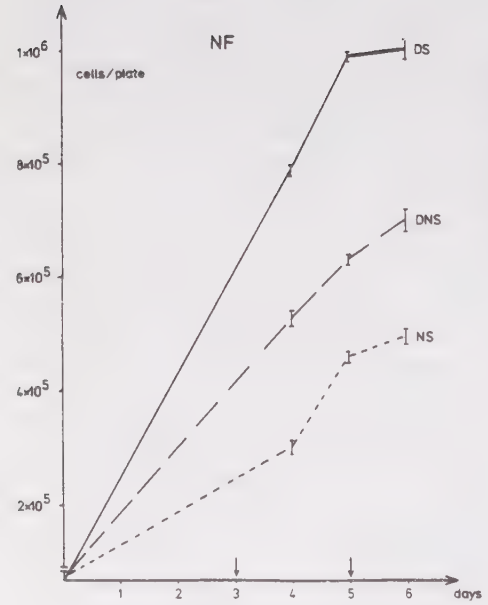



Abb. 51:
Effekt von DME + 10 % Serum von nicht insulinbedürftigen Diabetikern (DS), von Stoffwechselgesunden (NS) und einer Mischung von 5 % DS + 5 % NS (DNS) auf das Fibroblastenwachstum eines Stoffwechselgesunden (NF)

↓= Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

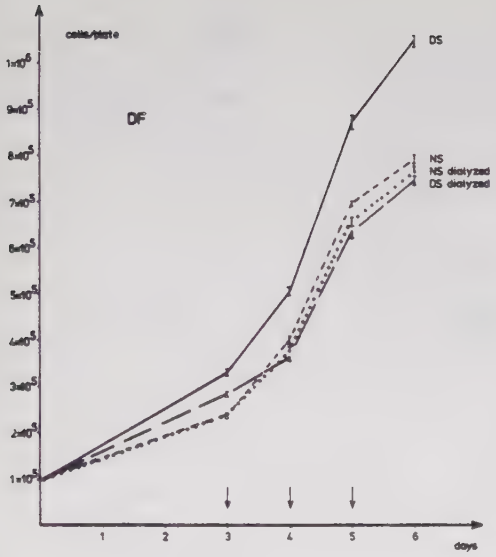



Abb. 52:
Effekt äquivalenter Mengen der jeweils gleichen Charge von Diabetikerserum (DS), dialysiertem DS mit einem MG >12.000 D, Normalserum (NS) und dialysiertem NS mit einem MG >12.000 D auf das Wachstum von Diabetikerfibroblasten (DF)

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

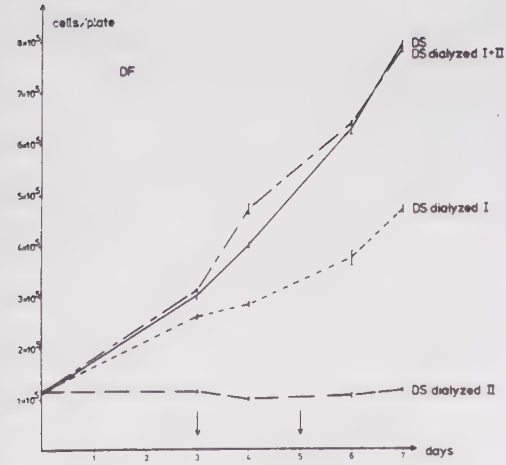



Abb. 53:
Effekt äquivalenter Mengen der gleichen Charge von Diabetikerserum (DS), dialysiertem DS mit einem MG >12.000 D (DS I), des DS-Dialysates mit einem MG <12.000 D (DS II) und der Kombination von DS I + -II auf das Wachstum von Diabetikerfibroblasten (DF)

↓ =Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

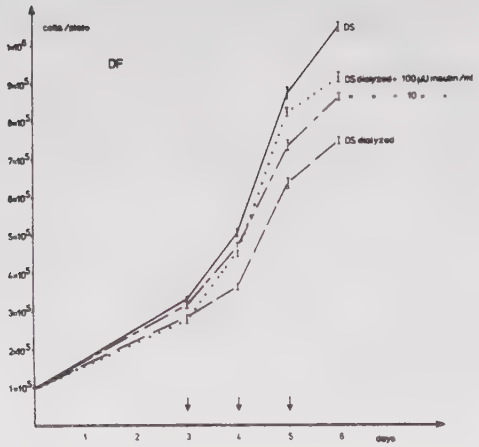



Abb. 54:
Effekt von DME + 10 % Diabetikerserum (DS) oder dialysiertem DS (MG > 12.000 D) ohne und mit Insulinzusatz (10 bzw. 100 µE/ml Inkubationsmedium ) auf das Wachstum von Diabetikerfibroblasten (DF)

↓= Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

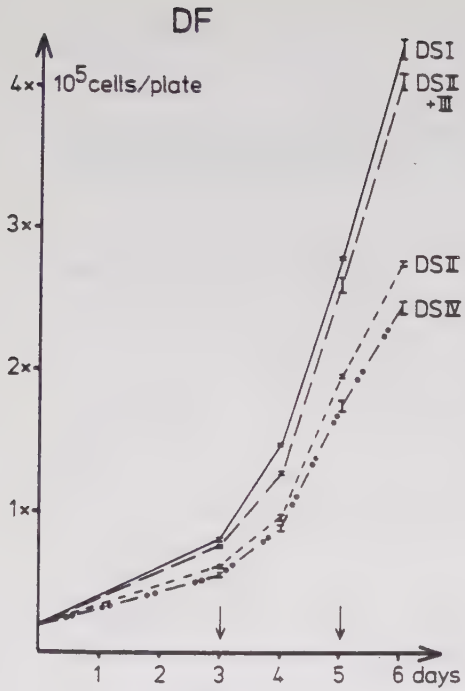



Abb. 55:
Effekt äquivalenter Mengen der gleichen Charge von Diabetikerserum (DS I), dialysiertem DS mit einem MG 12.000 D (DS II) oder MG 3.500 D (Spectrapor 6: 3.500 D) (DS IV) und der Kombination von DS II mit dem DS-Dialysat (Spectrapor 6: 3.500 D) auf das Wachstum von Diabetikerfibroblasten (DF)

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

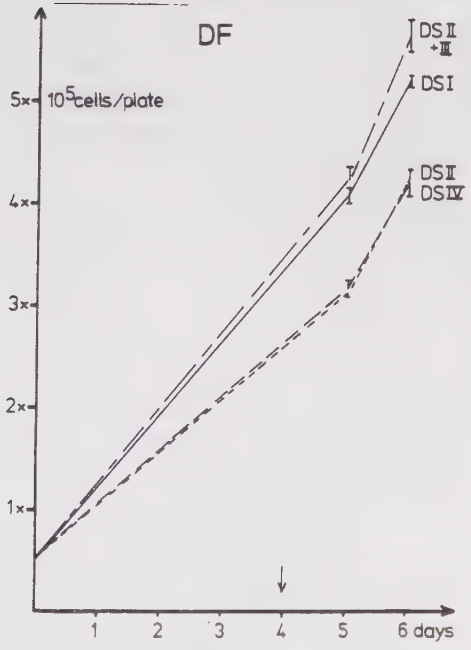



Abb. 56:
Effekt äquivalenter Mengen der gleichen Charge von Diabetikerserum (DSI), dialysiertem DS mit einem MG 3.500 D (Spectrapor 6: 3.500 D) (DS II) oder MG 1000 D (Spectrapor 6: 1000 D) (DS IV) und der Kombination von DS II mit dem DS-Dialysat (Spectrapor 6: 1000 D) (DS III) auf das Wachstum von Diabetikerfibroblasten (DF)

↓ =Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

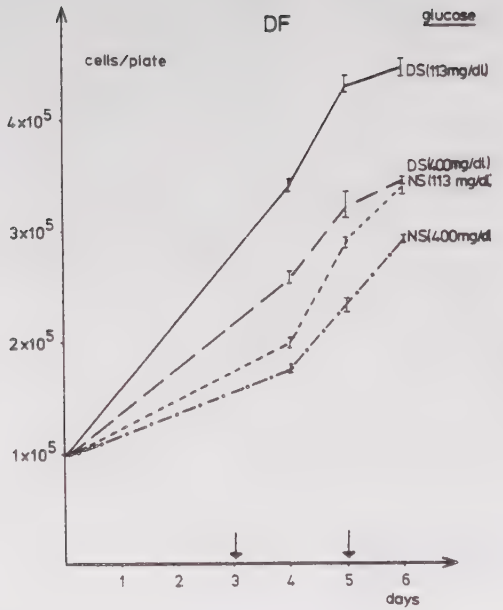



Abb. 57:
Effekt des Serums von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) und von Stoffwechselgesunden (NS) mit der gleichen Glukoseendkonzentration im Inkubationsmedium von 113 mg/dl bzw. 400 mg/dl auf das Wachstum von Diabetikerfibroblasten (DF)

↓ = Wechsel des Inkubationsmediums

I Mittelwert ± SEM

# 4. Diskussion

## 4.1. Änderungen des Wachstums mesenchymaler Zellen bei Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämien

Die Bedeutung von Änderungen der Wachstumseigenschaften mesenchymaler Zellen liegt in ihrer Beziehung zur Zellalterung, da bekanntlich die Teilungsfähigkeit von Fibroblasten zum Höchstalter der jeweiligen Art korreliert. Innerhalb einer Art ist die im Vergleich zum fetalen Ausgangszustand verbleibende Teilungsfähigkeit umgekehrt proportional zum jeweiligen Lebensalter des Spenders (120, 121). Bereits vor dem Ende ihrer Vermehrungsfähigkeit treten bei Fibroblasten wie arteriellen glatten Muskelzellen charakteristische funktionelle und morphologische Veränderungen auf,die als Ausdruck der Zellalterung angesehen und zu Alterungsvorgängen des Gesamtorganismus in Beziehung gesetzt werden (2, 51, 121, 122, 164, 167, 181).

Das vorzeitige und vermehrte Auftreten der Arteriosklerose bei Progerie, Diabetes mellitus und primären Hyperlipoproteinämien, die mit einer verkürzten Lebensdauer einhergehen, ist als ein Ausdruck der vorzeitigen Alterung besonders der mesenchymalen Arterienwandzellen gedeutet worden (20, 83, 89, 98, 102, 139, 283).

Diese Altersänderungen äußern sich in der Zellkultur z.B. in einer größeren Latenzzeit beim Auswachsen aus den Originalgewebsstücken,einer zunehmenden Verzögerung bei der Verdopplung der Zellzahl, einer verminderten Bereitschaft zum Wiederanwachsen bzw. zur Bildung neuer Zellkolonien nach Isolierung aus dem

Zellverband mittels proteolytischer Enzyme und erneuter Aussaat (97, 99-101, 179). Die Regulation dieser Vorgänge erfolgt offenbar durch den genetischen Apparat der Zelle, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen noch weitgehendunbekannt sind.

Die auf durchschnittlich 50 Verdopplungen der Zellzahl genetisch beschränkte Teilungsfähigkeit normaler menschlicher Fibroblasten hat zur Folge, daß jede erhöhte Wachstumsbereitschaft mesenchymaler Zellen, kurzfristig zu einer Beschleunigung der Verdopplung der Zellzahl und langfristig zu einer rascheren Erschöpfung der Teilungskapazität der besonders stimulierbaren Zellstämme führt (120, 121).

Im Zusammenhang mit Störungen des zellulären Wachstums sind auch pathologische Veränderungen der Basalmembran in verschiedenen Geweben, wie z.B. der Niere, der Lunge, des zentralen Nervensystems sowie der Gefäßkapillaren gebracht worden (136, 139, 195). Dabei wird als ein wesentlicher Faktor für die Verdickung der Basalmembran eine Beschleunigung der Umsatzrate der benachbarten Zellen mit vermehrt anfallenden degenerierten toten Zellen und rasch proliferierenden Ersatzzellen angesehen (274, 275, 283-285). Ähnlich den Altersringen von Bäumen, entsteht nach Ansicht dieser Autoren die lamellenförmige Struktur der verdickten Basalmembran mit eingelagerten Zellresten und Lipidtropfen wesentlich aus der Apposition dieser toten Zellen im Wechselspiel mit den nachwachsenden Zellen. Diese Veränderungen sind in typischer Weise beim Diabetes mellitus nachweisbar. Sie sindaber keinesfalls diabetesspezifisch,da sie ebenfalls im Rahmen des normalen Alterungsprozesses (139) und auch bei verschiedenen anderen Erkrankungen, wie z.B. dem Myxödem (59) und der Polymyositis auftreten (103).

Ein vermehrter Zellumsatz würde auch im Einklang stehen mit einer geringeren Teilungsfähigkeit der verbleibenden Zellpopulationen, die ihre limitierte Verdopplungskapazität vorzeitig aufbrauchen.

Zellulär fixierte Wachstumsänderungen beim Menschen

In der Literatur finden sich kontroverse Hinweise auf genetisch bedingte Störungen des Wachstums mesenchymaler Zellen beim Diabetes mellitus des Menschen. Als Zeichen einer beschleunigten Zellalterung sind bei Fibroblasten von insulinbedürftigen wie nicht-insulinbedürftigen Diabetikern im Vergleich zu altersgleichen Stoffwechselgesunden eine Verminderung der Zellteilungsfähigkeit (99, 285), der Aussaateffizienz, der Zellzahl bei Konfluenz und eine verzögerte Verdopplungszeit (100) beschrieben worden. Außerdem fand man bereits an Fibroblasten von genetischen Prädiabetikern Einschränkungen der Teilungsfähigkeit (101), die aber geringer waren als bei Diabetikern. Dagegen bestanden keine Unterschiede im Fibroblastenwachstum zwischen Typ I- und Typ II-Diabetikern (101). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme einer genetischen Prädisposition mit verändertem Wachstumsverhalten von mesenchymalen Diabetikerzellen.

Diese Annahme wurde auch gestützt durch andere , familiär gehäuft auftretende Krankheiten mit Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels, die mit einer deutlichen Verminderung der Fibroblastenteilungsfähigkeit einhergehen können, wie z.B. die Huntingtom'schen Krankheit (12), das Hutchinson-Gilford- und das Werner-Syndrom (173), die als Modell für vorzeitiges und beschleunigtes Altern angesehen werden.

Diese Befunde stehen aber nicht im Einklang mit ähnlichen Untersuchungen an Diabetikerfibroblasten von Pima-Indianern und von 4 Kindern kaukasischer Rasse (131), deren Wachstumsverhalten sich nicht von dem altersgleicher Kontrollen unterschied. Dabei wurden aber auch die Bedeutung und Problematik der Kontrollkollektive deutlich. Das Wachstumsverhalten der nicht-diabetischen Pima-Fibroblasten war im Vergleich zu Fibroblasten von Personen kaukasischer Rasse reduziert. Diese Ergebnisse sind ein deutliches Beispiel für die genetische Heterogenität, die bei der Interpretation solcher Daten besonders berücksichtigt werden muß.

Hinzu kommt, daß bei diesen Untersuchungen an Fibroblasten von Diabetikern nur unzureichende Informationen über Ausmaß und Dauer einer schlechten Stoffwechseleinstellung vorliegen. Daher können diese Untersuchungen nicht unmittelbar miteinander verglichen werden und lassen die Frage weiterhin offen, ob eine beschleunigte Zellalterung ein generelles Prinzip beim Diabetes mellitus darstellt.

Im Gegensatz dazu stehen Befunde einer signifikant erhöhten Proliferationsrate von Prä- und Adipozyten 25 übergewichtiger Typ II-Diabetiker, die bis zur 6. Passage in der Zellkultur gezüchtet wurden (287). Diese Adipozyten besaßen eine gesteigerte Lipogenese im Vergleich zu Adipozyten Stoffwechselgesunder. Diese Änderungen des Wachstums und der Lipogenese waren nur zur diabetischen Stoffwechsellage und nicht zum Übergewicht korreliert,da sie nur in gezüchteten Adipozyten übergewichtiger Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung, dagegen nicht in Adipozyten gleich übergewichtiger, aber nicht-diabetischer

Personen nachweisbar waren. Ungeklärt blieb, ob die zellulär fixierte Änderung der Wachstumseigenschaft dieser Diabetikeradipozyten Ausdruck eines diabetesspezifischen Gendefekts ist und/oder ob andere Mechanismen für diese Veränderungen verantwortlich sein können.

Mit den vorliegenden Untersuchungen (Abschnitt 3.1.1.1.) konnte erstmals unter kontrollierten in-vitro-Bedingungen eine zellulär fixierte Steigerung der Wachstumsfähigkeit mesenchymaler Zellen beim Typ I- und Typ II-Diabetes mellitus des Menschen nachgewiesen werden.

Der Nachweis zellulär fixierter, in der Zellkultur über viele Passagen persistierender Änderungen von Wachstumseigenschaften mesenchymaler Zellen von Patienten mit familiärer Diabetesbelastung steht im Einklang

1. mit der erhöhten Proliferationsrate von Prä- und Adipozyten von Typ II-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung und
2. mit der Annahme einer genetischen Prädisposition zu verändertem Wachstumsverhalten von mesenchymalen Diabetikerzellen.

Dagegen stimmen diese Ergebnisse nicht mit den Untersuchungen an Diabetikerfibroblasten von Pima-Indianern überein, wobei die Vergleichbarkeit der Befunde, außer durch die rassischen Unterschiede aus den bereits erwähnten Gründen erschwert ist.

Eine gemeinsame genetisch bedingte Änderung der Wachstumseigenschaften könnte trotz der unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur dann vorliegen, wenn sich die verschiedenen Diabetiker und ihre mesenchymalen Zellen in verschiedenen physiologischen Altersstadien befanden. Dann könnten im Vergleich zu altersgleichen Normalzellen schneller proliferierende mesenchymale Zellen einer frühen

Phase und langsamer proliferierende Zellen einer späten Phase der vorzeitigen Zellalterung entsprechen. Die Auswirkungen auf den Alterungsprozeß des Gesamtorganismus würden dabei wesentlich vom Umfang des zusätzlichen Wachstums, seiner Dauer und der Gesamtzahl betroffener Zellen wie deren Lokalisation abhängen.

Aus dieser Sicht könnte auch die erstmals beschriebene zellulär fixierte Verminderung der Wachstumsfähigkeit mesenchymaler Zellen von Patienten mit familiären Hyperlipoproteinämien (Abschnitt 3.1.1.2.) genetisch abhängig und Ausdruck einer späten Phase einer vorzeitigen Zellalterung sein können.

Obwohl diese Änderungen der Wachstumseigenschaften in vitro unabhängig von der Einwirkung extrazellulärer metabolischer Faktoren persistieren, blieb offen, wie diabetes- bzw. hyperlipoproteinämie-spezifisch diese zellassoziierte Alteration ist und ob erst das Zusammenwirken von genetisch prädisponierten mesenchymalen Zellen und extrazellulären Faktoren die beschriebenen Wachstumsänderungen klinisch manifest und bedeutsam werden läßt. Die vorliegenden Untersuchungen an mesenchymalen Zellen von pankreatektomierten Diabetikern und von Diabetikern mit optimaler Stoffwechseleinstellung deuten auf die besondere Bedeutung metabolischer Faktoren bei der Manifestation der Wachstumsalterationen von mesenchymalen Zellen hin (270).
Dabei fällt auf:

1. Die erstmals an Fibroblasten pankreatektomierter Diabe-
   ohne familiäre Diabetesbelastung nachgewiesene
   Steigerung der Wachstumsbereitschaft wird nur bei
   schlechter Stoffwechseleinstellung manifest
   (Abschnitt 3.1.1.1.).

2. Bei optimaler Diabeteseinstellung seit Diabetesdiagnose ist eine Änderung der Wachstumseigenschaft mesenchymaler Zellen unabhängig vom Vorliegen einer familiären Diabetesbelastung weder bei einem pankreatektomierten Diabetiker noch bei einem Typ II-Diabetiker mit familiärer Belastung nachweisbar.

In diesem Zusammenhang bieten die Ergebnisse tierexperimenteller Untersuchungen zusätzliche Informationen, die zur Beurteilung der Ergebnisse mit mesenchymalen Zellen vom Menschen herangezogen werden können.

Zellulär fixierte Wachstumsänderung bei verschiedenen Tierspezies im Vergleich zum Menschen

In der Arterienwand verschiedener Spezies wird die fokal gesteigerte Proliferation arterieller glatter Muskelzellen als ein Schlüsselelement in der Frühphase der Atherogenese angesehen (115, 229-232, 257). Ungeklärt ist dabei die Bedeutung des Nachweises von überwiegend monoklonalen arteriellen glatten Muskelzellpopulationen in den arteriosklerotischen Plaques, deren vermehrtes Auftreten ursprünglich als mutagen bedingte Änderung der zellulären Wachstumseigenschaften im Sinne eines gutartigen Tumors gedeutet wurde (21, 237). Wahrscheinlicher sind aber Selektionen prädisponierter Zellstämme mit erhöhter Wachstumsneigung aus dem heterogenen mesenchymalen Zellpool der arteriellen Gefäßwand (115, 273). Die dafür verantwortlichen zellulären Eigenschaften sind bisher aber kaum untersucht worden, wie z.B. die postulierte Prädisposition zu erhöhter Ansprechbarkeit gegenüber extrazellulären Faktoren.

Mesenchymale Zellen verschiedener Spezies einschließlich des Menschen besitzen spezifische Rezeptoren für verschiedene, das Zellwachstum beeinflussende, humorale Faktoren (5, 271), z.B. für das Wachstumshormon (55,192),

Somatomedine (49, 207), Insulin (6,119, 128, 141, 142, 145, 185, 215, 217, 267, 269, 272), Insulin like-growth-factor I und II (219, 297), 3-Jod-Thyronin und Thyroxin (47), Wachstumsfaktor aus Thrombozyten (124, 233, 263), Transferrin (111, 134), epidermaler (56, 78) und endothelialer Wachstumsfaktor (39, 169) oder LDL (70, 71, 188, 189).

Genetisch bedingte Rezeptordefekte an mesenchymalen Zellen könnten deren Wachstumseigenschaften erheblich verändern. Solche Defekte sind z.B. an Hautfibroblasten der diabetischen (db/db) Maus für Insulinrezeptoren beschrieben worden (214), deren Zahl konstant auf die Hälfte bis zu einem Drittel in der Zellkultur erniedrigt ist. Eine konstante Verminderung der Insulinrezeptorbindung um 35 - 45 % ist an kultivierten menschlichen Fibroblasten bisher nur bei Necrobiosis lipoidica diabeticorum (48), bei der diabetischen Lipatrophie (174, 194) und bei Leprechaunism (241) beschrieben worden. Bei Patienten mit einem Syndrom von Insulinresistenz und Acanthosis nigricans ist bisher eine Verminderung der Insulinrezeptorenzahl nur an Monozyten nachgewiesen. Dagegen sind genetisch bedingte Strukturdefekte am Insulinrezeptor mesenchymaler Zellen von Diabetikern und Hyperlipämikern bisher nicht bekannt geworden (132, 135, 251).

Dies gilt in ähnlicher Weise auch für den Wachstumshormonrezeptor, dessen Zahl nur beim seltenen, von Laron beschriebenen menschlichen Zwergwuchs deutlich erniedrigt ist (155).

Dabei sind diese spezifischen Rezeptoren in mesenchymalen Zellen nicht nur von der genetischen Codierung abhängig, sondern auch von physiologischen Zellvariablen (129), wie der Wachstumsphase (130, 223), dem Zellteilungs-

zyklus (272), dem Grad der Zelldifferenzierung (175) oder Zelltransformierung (Carcinomzelle) (191, 210) und dem Alter des Spenders (25, 224).

Die Bedeutung der Interaktion genetisch prädisponierter mesenchymaler Zellen mit extrazellulären Faktoren geht aus Wachstumsuntersuchungen an arteriellen glatten Muskelzellen von Ratten, Kaninchen und Mini-Schweinen hervor. In diesen stoffwechselgesunden Tieren wurden experimentell arterielle Hypertension (Zellophan-Perinephritis), Hyperlipoproteinämie (atherogene Diät) oder Diabetes (Alloxan oder Streptozotocin) induziert (26, 58, 208). 2-6 Wochen nach Bestehen dieser das atherogene Risiko erhöhenden Krankheiten waren in der arteriellen Gefäßwand vermehrte Proliferationen von Endothel- und glatten Muskelzellen sowie Adventitia-Fibroblasten nachweisbar (160). Auch in der nachfolgenden Zellkultur, z.B. der arteriellen glatten Muskelzellen, persistierte eine gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen signifikant erhöhte Proliferationsrate durch mehrere Passagen (58,115). Dies war unabhängig davon, daß das extrazelluläre Milieu - ein Standardinkubationsmedium mit Zusatz von 10 % foetalem Kälberserum - während 3-4 Wochen vollständig normal war. Da eine genetische Alteration dieser arteriellen glatten Muskelzellen, z.B. durch eine einmalige diabetogene Injektion von Alloxan oder Streptozotocin nicht angenommen werden kann, ist am wahrscheinlichsten, daß Selektionsmechanismen eine entscheidende Rolle spielen. Aus einer heterogenen arteriellen glatten Muskelzellpopulation (58) würden demnach prädisponierte Zellen, die normalerweise nur in geringerer Menge in der Gefäßwand existieren, bevorzugt auswachsen, wenn ihr Wachstum z.B. durch diabetische oder hyperlipämische Serumfaktoren besonders stimuliert wird.

Auf einen solchen Selektionsmechanismus deutet auch die Möglichkeit, z.B. den Effekt der Hypertension oder atherogenen Diät auf die arteriellen glatten Muskelzellen der Ratte durch gleichzeitige regelmäßige in vivo-Gabe von proliferationshemmenden Substanzen wie Prednisolon, D-Penicillamin oder Acetylsalicylsäure unterdrücken zu können (9, 115).

Diese Tiermodelle zeigen deutliche Parallelen zu den Ergebnissen mit Fibroblasten von pankreatektomierten Diabetikern ohne familiäre Diabetesbelastung:

1. Ein durch einen einmaligen externen Eingriff erworbener Insulinmangeldiabetes ohne erkennbare genetische Vorbelastung und eine relativ kurze Diabetesdauer mit schlechter Stoffwechseleinstellung über 1 1/2 - 2 1/2 Jahre führt in der Zellkultur zur Persistenz einer signifikant erhöhten Proliferationsrate mesenchymaler Zellen über mehrere Passagen unabhängig von einer vollständigen Normalisierung des extrazellulären Milieus über mehrere Wochen (Abschnitt 3.1.1.1.).
2. Die Fibroblasten von einem pankreatektomierten wie einem primären Typ II-Diabetiker, deren Stoffwechsel durch aktive und dauerhafte Therapie seit Diabetesbeginn gut eingestellt war, zeigen ein normales Wachstumsverhalten.

Diese Ergebnisse geben weder im Tiermodell noch beim Menschen einen Hinweis auf eine diabetesspezifische, genetische Alteration, die zu einer Änderung der Wachstumseigenschaften mesenchymaler Zellen in vitro in Beziehung steht.

Das o.g. Tiermodell könnte möglicherweise auch zum Verständnis der Wachstumseigenschaften der Fibroblasten von

Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien beitragen. Diese Zellinien waren im Vergleich zu den Diabetikerfibroblastenlinien mit einer Ausnahme (Patient Nr. 8: Tabelle 6a) über einen viel längeren Zeitraum der wachstumssteigernden Wirkung der Hyperlipoproteinämiefaktoren exponiert. Während das Fibroblastenwachstum des Patienten Nr. 8, dessen Hyperlipoproteinämiedauer seit Diagnose erst 1 Jahr betrug, noch um 10-15 % gesteigert war, war das Fibroblastenwachstum der übrigen Hyperlipämiker in unterschiedlichem Ausmaß in allen Fällen mit einer Hyperlipoproteinämiedauer von 6-19 Jahre seit Diagnose im Vergleich zu Kontrollfibroblasten erniedrigt (Abschnitt 3.1.1.2.).

Ähnlich wie bei den Diabetikerfibroblasten und den arteriellen glatten Muskelzellen der Ratten mit experimentell induziertem Diabetes oder Hyperlipoproteinämie könnte eine kurze Hyperlipoproteinämiedauer in der Zellkultur zu einer Persistenz einer erhöhten Proliferationsrate mesenchymaler Zellen über mehrere Passagen führen. Dagegen könnte eine längere Hyperlipoproteinämiedauer zu einer rascheren Erschöpfung der Teilungskapazität der zusätzlich stimulierten Zellstämme und zu einer zunehmend geringeren Teilungsfähigkeit der verbleibenden Zellpopulationen im Sinne eines vorzeitigen Alterns beitragen.

Diese Ergebnisse schließen zwar eine diabetes- bzw. hyperlipoproteinämiespezifische, genetische Änderung der Wachstumseigenschaften mesenchymaler Zellen beim Menschen nicht aus. Sie dokumentieren aber die Möglichkeit, daß extrazelluläre Faktoren zumindest als Manifestationsfaktor dauerhafte, strukturelle Änderungen von Geweben bewirken. Dies könnte durch Selektion von mesenchymalen Zellen mit gesteigerter Wachstumsbereitschaft und mit möglicherweise noch anderen veränderten Stoffwechsel-

eigenschaften erfolgen, die im Zusammenhang mit angiopathischen Veränderungen und Alterungsvorgängen in vivo gebracht werden können.

Einflüsse von Serumfaktoren auf das Wachstum

Serum enthält einen kompletten Satz an Faktoren, die mesenchymale Zellen nicht nur auf das Durchlaufen der 4 Phasen des Wachstumszyklus vorbereiten und die DNS-Synthese einleiten ("competence factors"), sondern auch den Abschluß dieses Zyklus mit der kompletten Zellteilung ermöglichen ("progression factors") (263). Das Fehlen eines Faktors aus einem dieser Bereiche vermag mesenchymale Zellen zwar noch in einem Stadium der erhöhten Wachstumsbereitschaft zu halten, verhindert aber ein komplettes Wachstum mit Zellteilung, ein in der Zellbiologie bekanntes Phänomen.

Ein physiologisch wichtiger "competence factor" für die mesenchymalen Zellen des Menschen ist der in den Alpha-Granula der Thrombozyten enthaltene Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor: MG 30.000 Daltons), der aber nur bei der Aggregation von Thrombozyten freigesetzt wird (85, 228-233). Dieser Thrombozytenfaktor seinerseits besitzt keine eigene "progression factor"-Aktivität und ist daher auf die Interaktion mit solchen Faktoren für einen kompletten Wachstumseffekt angewiesen (282).

Die mögliche pathophysiologische Relevanz des Wachstumsfaktors aus Thrombozyten geht aus Untersuchungen der Pathogenese der frühen Entwicklungsstadien der Arteriosklerose in verschiedenen Tierspezies hervor. Bei Affen konnte gezeigt werden, daß die in der Arterienintima durch Proliferation glatter Muskelzellen entstehenden Läsionen dadurch verursacht werden, daß Thrombozyten nur an den Stellen der Arterienwand festhafteten und Wachstumsfaktor freisetzten, an denen das Endothel geschädigt war. Ex-

perimentell induzierte Läsionen mit atherogener Wirkung konnten durch gleichzeitige Gabe von Dipyridamol, einem spezifischen Hemmer der Thrombozytenaggregation, verhindert werden (112). In ähnlicher Weise verhinderte eine genetisch bedingte Dysfunktion der Thrombozyten in chronisch-hypercholesterinämischen Schweinen mit von Willebrandt-Erkrankung (81) oder die Entfernung von Thrombozyten aus dem Blut mittels spezifischer Antikörper in Kaninchen (112) die Entwicklung typischer experimentell induzierter arteriosklerotischer Intimaveränderungen mit proliferierenden glatten Muskelzellen.

Bei der Beurteilung der Bedeutung dieses Faktors für die normale Wachstumsregulation wird man berücksichtigen müssen, daß in vivo normalerweise Zellen nur dem Plasma oder dem Plasmafiltrat exponiert sind. Der Schwerpunkt der physiologischen Funktion dieses Wachstumsfaktors aus Thrombozyten liegt daher in der Beteiligung bei der Wundheilung durch Steigerung der Proliferation als auch des Kollagen- und Proteinstoffwechsels von Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen, während z.B. Endothelzellen nicht stimuliert werden (226-228, 230, 232). Soweit dieser Faktor an der Atherogenese beteiligt ist, könnte man diese Gefäßerkrankung als die pathologische Entgleisung eines chronischen Wundheilungsversuches nach Endothelläsionen deuten.

Bei insulinpflichtigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung und Spätkomplikationen nach längerer Diabetesdauer sowie bei arteriosklerotischen Hypercholesterinämikern sind vermehrt Störungen der Thrombozytenfunktion, wie eine Erhöhung der Thrombozytenaggregation, eine Verkürzung der Thrombozytenlebenszeit und eine Erhöhung der Beta-Thromboglobulinspiegel im

Blut nachweisbar (27). Im Serum- und Thrombozytenextrakt von 5 ausgewählten, insulinpflichtigen Diabetikern mit solchen Störungen der Thrombozytenfunktion wie auch im Serum spontan-diabetischer Ratten wurde eine vermehrte Aktivität eines Wachstumsfaktors aus Thrombozyten nachgewiesen (279). Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß selbst bei einem bereits vorselektierten Diabetikerkollektiv mit Angiopathien etwa 2/3 der untersuchten Diabetiker noch eine normale Thrombozytenfunktion aufweisen und daß bei nicht-insulinpflichtigen Typ II-Diabetikern mit 1-5-jähriger Diabetesdauer die Thrombozytenfunktion, gemessen an den o.g. Parametern in der Regel normal ist (27).

Eine normale Thrombozytenfunktion im Gesamtorganismus schließt aber nicht aus, daß es im beschränkten Umfang im Bereich begrenzter Endothelläsionen von arteriellen Prädilektionsstellen wiederholt zur Freisetzung von Thrombozytenwachstumsfaktoren kommt, die besonders in Kombination mit niedermolekularen "progression factors" zur fokalen Wachstumsreaktion mesenchymaler Zellen und über längere Zeit bis zu irreversiblen, angiopathischen Veränderungen führen kann.

"Progression factors" von physiologischer Bedeutung mit unterschiedlich starker Aktivität, gemessen am BALB-3 T3-Fibroblasten, sind vorwiegend niedermolekulare Substanzen, z.B. Insulin like-growth-factor I und II, Insulin und Hydrocortison (263).

Die das Wachstum mesenchymaler Zellen zusätzlich steigernde Wirkung von Diabetikerserum, die bei Seren von Typ I-Diabetikern kürzlich erkannt wurde (158, 159), und bei Typ II-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung jetzt erstmals und systematisch beschrieben

worden ist, belegt eindeutig, daß das Wachstumsverhalten mesenchymaler Zellen außer durch zellulär fixierte Strukturen wesentlich durch Änderungen extrazellulärer humoraler Faktoren bestimmt werden kann (Abschnitt 3.2.1.1.) (146, 147). Aber die zusätzliche Wachstumspotenz im Serum von Typ II-Diabetikern schwankt in Abhängigkeit von der Güte der Stoffwechseleinstellung und kann durch deren Verbesserung normalisiert werden (Abschnitt 3.2.2.1.). Damit bieten diese Befunde eine neue Möglichkeit, die durch eine dauerhafte Normalisierung der diabetischen Stoffwechseleinstellung erreichbare Verminderung eines potentiellen angiopathischen Risikofaktors objektiv zu belegen.

Dies ist unabhängig davon, daß bisher nicht präzise bekannt ist, ob diese zusätzliche Wachstumsstimulation

a) durch einen oder mehrere Faktoren,
b) allein durch quantitative Veränderungen bereits im Serum Stoffwechselgesunder in niedrigen Konzentrationen vorhandener Substanzen oder
c) durch abnorme, stoffwechselabhängig neu gebildete Substanzen im Serum hervorgerufen werden.

Die bisherigen, nicht abgeschlossenen Untersuchungen zur Charakterisierung von Wachstumsfaktoren belegen, daß die zusätzliche wachstumsstimulierende Wirkung in dem Diabetikerserum im wesentlichen nur in einer Fraktion im Molekulargewichtsbereich um 1.000 Daltons enthalten ist (Abschnitt 3.3.). Der Wachstumseffekt dieser DS-Fraktion wird nicht durch ein Peptid verursacht und ist vom Zusammenwirken hydrophiler und hydrophober Anteile dieser Fraktion abhängig. Damit wird erstmals das bisher bekannte Spektrum höhermolekularer Wachstumsfaktoren im Serum von Typ I-Diabetikern in einen neuen, bisher unbekannten niedermolekularen Bereich erweitert.

Auffälligerweise kann aber die Wachstumsstimulation der niedermolekularen Diabetikerserumfraktion für sich allein, unter Einschluß aller übrigen potentiellen Wachstumsfaktoren mit einem Molekulargewicht <12.000 Daltons, wie z.B. Insulin oder Insulin-like-growth-factor I und II nicht wirksam werden. Zur Realisation dieser Wirkung sind ein oder mehrere Serummoleküle mit einem Molekulargewicht >12.000 Daltons unabdingbar. Da die niedermolekulare Diabetikerserumfraktion in gleichem Ausmaß sowohl mit der höhermolekularen Serumfraktion von Diabetikern als auch von Stoffwechselgesunden wirksam wird, ist eine Diabetesspezifität der höhermolekularen Substanzen nicht erkennbar.

Offensichtlich enthält die Serumfraktion mit einem Molekulargewicht >12.000 Daltons sowohl bei Diabetikern als auch bei Stoffwechselgesunden eine ausreichende Zahl von "competence"- und "progression"-Faktoren für ein komplettes Wachstum mit Zellteilung (Abschnitt 3.2.1.1., 3.2.2.1.). Es ist wahrscheinlich, daß die das Wachstum zusätzlich stimulierende niedermolekulare Diabetikerserumfraktion im Molekulargewichtsbereich um 1000 Daltons der Gruppe der "progression factors" zugehört, da diese vorwiegend niedermolekularer Natur sind.

Soweit die in-vitro-Ergebnisse auf die in vivo-Situation übertragbar sind, könnten diese Eigenschaften auch zum besonderen angiopathischen Risiko beim Diabetes beitragen. Das sehr niedrige Molekulargewicht könnte die Infiltration in das Gewebe und die Aufnahme in die mesenchymalen Zellen z.B. der Gefäßwand im Vergleich zu höhermolekularen Substanzen sehr erleichtern. Dadurch würde zwar das Zellwachstum noch nicht erhöht, auf diese Weise könnte aber in diesen Zellen eine Prädisposition zu erhöhter Ansprechbarkeit gegenüber anderen extrazellulären Faktoren ge-

schaffen werden, die sich nicht nur auf das Wachstum sondern auch auf andere zelluläre Stoffwechselleistungen auswirken könnte. Erst durch die Kombination von "competence factors" für den Wachstumszyklus mit einem Molekulargewicht > 12.000 Daltons würde die erhöhte Wachstumsbereitschaft durch gesteigerte Zellteilung realisiert.

Gegenüber der niedermolekularen Diabetikerserumfraktion und dem Thrombozytenwachstumsfaktor treten in den Seren von Typ II-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung andere Substanzen mit wachstumssteigernder Wirkung, wie z.B. Wachstumshormon (55, 177), Insulin (22, 267), Insulin like-growth-factor I und II (219, 297), Corticosteroide (163), Lipoproteine (70,71) oder Aminosäuren (197) in ihrer Bedeutung als zusätzlich stimulierende Wachstumsfaktoren in den Hintergrund.

Unter Zellkulturbedingungen (10 % Serumzusatz) sind selbst 2- bis 3-fach höhere Serumkonzentrationen von Insulin ohne wesentliche Bedeutung für das Zellwachstum. Damit im Einklang steht auch, daß die Erhöhung der Insulinkonzentration im Zellinkubationsmedium bis auf 100 µE/ml ebenfalls nicht die Wachstumswirkung des undialysierten Diabetikerserums erreicht (Tab. 1a, Abb. 54). Um so weniger ist eine zusätzliche Wachstumswirkung von Wachstumshormon, Insulin-like-growth-factor I und II und Cholesterin zu erwarten, deren Serumkonzentrationen innerhalb des Normbereiches lagen (Tab. 1a). Das schließt aber ebenfalls nicht aus, daß sich deren Wirkung zusammen mit der niedermolekularen Diabetikerserumfraktion auswirkt und daß in bestimmten Kollektiven z.B. die Erhöhung der Wachstumshormon- oder der LDL-Konzentration im Blut (158) den wesentlichen Anteil einer zusätzlichen Wachstumsstimulation mesenchymaler Zellen darstellt.

Glukosekonzentrationen bis zu 600 mg/dl beeinflussen kaum das Wachstum kultivierter Fibroblasten und arterieller glatter Muskelzellen oder verlangsamen es, wobei ein osmotischer Effekt als Teilfaktor angenommen wurde (186, 278). Diese Befunde bestätigen die wachstumsvermindernde Wirkung erhöhter Glukosekonzentrationen im extrazellulären Medium von mesenchymalen Zellen (Abschnitt 3.3., Abb. 57).

Dagegen wurden erhöhte LDL-Konzentrationen im Serum von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie oder von Kaninchen bzw. Affen mit diätetisch induzierter Hypercholesterinämie als wesentlicher Teilfaktor für das gesteigerte Zellwachstum nachgewiesen (70, 71, 204, 209). Die hier verwendeten Hypercholesterinämikerseren stimulierten das Fibroblastenwachstum in einer dem Diabetikerserum vergleichbaren Weise, wobei keine prinzipiellen Unterschiede zwischen Fibroblasten von Stoffwechselgesunden und von Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien oder Diabetikern bestanden.

Die LDL-Moleküle (d = 1.006 - 1.063 g/l) aus Hypercholesterinämikerserum unterscheiden sich bei äquimolaren Konzentrationen in ihrem wachstumssteigernden Effekt von LDL-Molekülen aus dem gleichen Dichtebereich von Stoffwechselgesunden, die auch bei erhöhten Konzentrationen im Inkubationsmedium das Zellwachstum nicht weiter zu steigern vermögen. Nur bei Isolierung einer normalen LDL-Teilfraktion aus einem begrenzten Dichtebereich (Maximum d = 1.027 g/l) ließen sich konzentrationsabhängige Wachstumssteigerungen in arteriellen glatten Muskelzellen erzielen, die derjenigen hypercholesterinämischer LDL vergleichbar waren (71).

Die Bedeutung von Lipoproteinen als Teilfaktor für das mesenchymale Zellwachstum geht auch aus Untersuchungen mit Serum von Patienten mit A-Beta-Lipoproteinämien (Fehlen von Apo-B-haltigen Lipoproteinen) hervor, das im Vergleich zu normalem Serum nur verzögertes Wachstum von Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen zuließ (156). Zusatz von normaler LDL zum A-Beta-Lipoproteinämieserum konnte die Wachstumsminderung nur zur Hälfte beseitigen. Erst die gleichzeitige Zugabe des Lysates normaler Thrombozyten führte zu normalisiertem Wachstum, während das Lysat autologer Thrombozyten keine vergleichbare wachstumsstimulierende Aktivität enthielt. Inwieweit bei Hyperlipämikern die Menge, Struktur und Freisetzung eines Wachstumsfaktors aus Thrombozyten pathologisch verändert ist, ist bisher nicht bekannt.

Das mesenchymale Zellwachstum wird auch deutlich verlangsamt oder je nach Zelltyp gar nicht mehr ermöglicht in einem Inkubationsmedium, dem alle Lipoproteine und dialysierbaren niedermolekularen Serumbestandteile entzogen bzw. dem nur vollständig delipidierte Serumproteine zugesetzt worden sind (235).

Ob dagegen LDL aus Serum von Typ II-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung eine vergleichbare Wachstumsstimulation mesenchymaler Zellen bewirkt, und ob diese LDL einen erhöhten Anteil der Fraktion mit dem Dichtemaximum bei d = 1.027 g/l besitzt, ist bisher nicht detailliert untersucht worden.

## 4.2. Änderungen der Proteinsynthese mesenchymaler Zellen

Die enge Beziehung zwischen Wachstum- und Proteinstoffwechsel wird zum einen durch die lineare positive Korrelation zwischen Zellzahl bzw. DNS und Proteingehalt/Platte und zum anderen durch die lineare negative Korrelation zwischen Proteinsynthese/Zelle und der Zelldichte/Platte belegt, die bei allen Zellinien der Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen serumunabhängig bestanden (Abschnitt 3.1.1.). Mit den relativ unspezifischen Untersuchungen des Einbaus von radioaktiv markierten Aminosäuren in zelluläre Proteine waren Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen nicht faßbar. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen an Diabetikerfibroblasten, bei denen die gesamte Proteinsynthese nicht wesentlich von der in Kontrollfibroblasten differierte, bei denen aber eine detailliertere Analyse die Synthese abnormer Kollagene aufdeckte (144, 250). In anderen gezüchteten Diabetiker- und Hyperlipämikerfibroblasten sind eine gesteigerte Synthese von normalen Proteinen wie abnormalen Glykoproteinen beobachtet worden (68, 74, 138, 238, 245, 291). Diese Veränderungen können mit den Wachstumsstörungen zusammenhängen und sind in Beziehung gesetzt worden zur Akkumulation von extrazellulären Bindegewebssubstanzen (247), wie sie für Alterungsprozesse oder diabetische Mikro- und Makroangiopathien charakteristisch sind.

Die Bedeutung von Faktoren im Serum von Typ II-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung wird auch an der signifikanten Steigerung der Proteinsynthese, gemessen am $^{14}$C-Leucin bzw. -Prolineinbau pro Zelle, um 30-40 % deutlich. Dabei wirken sich diese Diabetikerserumfaktoren gleichzeitig auf mehrere Bereiche

des Proteinstoffwechsels aus, wie aus der im Verhältnis zur Menge der neusynthetisierten Proteine verminderten und verzögerten Proteinabgabe in den Extrazellulärraum hervorgeht (Abschnitt 3.2.1.2.)
Auch Änderungen der Glukosekonzentration können zu erheblichen Veränderungen des Proteinstoffwechsels führen. Glukose steigert in menschlichen Fibroblasten konzentrationsabhängig zwischen 100 und 700 mg/dl die Synthese und Sekretion abnormalen Kollagens (281). Dabei besteht die Möglichkeit, daß sich zugleich der Grad der nicht-enzymatischen Glykosidierung und damit die Struktur des unter hyperglykämischen Bedingungen entstehenden Kollagens ändert. Eine klinische Relevanz könnten solche Veränderungen im Zusammenhang mit der Dickenzunahme der Basalmembranen beim Diabetes mellitus besitzen. An Basalmembranpartikeln, die aus den Nierenglomerula von Diabetikern isoliert worden waren, hat sich eine mit der Schwere und der Dauer des Diabetes mellitus zunehmende Glykosidierung des Hydroxlysins und Hydroxyprolins des Kollagens nachweisen lassen (253). Solche Glykosidierungen, die sehr wahrscheinlich die Grenzschichtfunktion der Basalmembranen verändern, könnten mit für die diabetische Glomerulopathie wie auch für andere Lokalisationen der diabetischen Mikroangiopathie verantwortlich sein.

Zusätzlich wird in vivo auch der die Proteinsynthese steigernde Effekt des Insulins berücksichtigt werden müssen, dessen Blutspiegel bei vielen Typ II-Diabetikern wie auch primären Hypertriglyceridämikern bereits im Nüchternzustand auf das 2-3-fache der Norm erhöht ist.

Auch Serum von Patienten mit Hypercholesterinämie und von hypercholesterinämischen Ratten steigert in vitro die Kollagensynthese in mesenchymalen Zellen (220). In der arteriosklerotischen Aortenwand von Kaninchen mit diätetisch induzierter Hypercholesterinämie (198) ist die Protein-, Kollagen- und Elastinsynthese ebenfalls erhöht (209) und resultiert in einer vermehrten Ablagerung extrazellulärer Bindegewebssubstanz. Die erhöhte Syntheserate kann durch gleichzeitige Dexamethasongabe normalisiert werden (9). Dagegen hat normale LDL vom Menschen in menschlichen Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen keinen Einfluß auf die Proteoglykansynthese und -verteilung auf das intra-, peri- und extrazelluläre Kompartiment (268). Ob Lipoproteine aus Diabetikerseren spezifische Wirkungen auf den Protein- und Kollagenstoffwechsel ausüben, ist bisher nicht untersucht worden.

## 4.3. Änderungen des Lipoproteinstoffwechsels mesenchymaler Zellen

Zellulär fixierte Störungen des Lipoproteinstoffwechsels sind in den letzten Jahren umfassend an mesenchymalen Zellen von homozygoten Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie untersucht worden (29-31, 117, 259). Dabei konnten am spezifischen Rezeptor für LDL mehrere, genetisch bedingte Strukturdefekte nachgewiesen werden, die zu einer gestörten Regulation des LDL- und Cholesterinstoffwechsels in vitro und in vivo führen (33, 117). Damit im Zusammenhang steht die vorzeitige Entwicklung einer ausgeprägten Arteriosklerose und ein stark erhöhtes Mortalitätsrisiko dieser Patienten (93, 94, 117). Trotz der großen Bedeutung, die die Erforschung dieses Gendefektes für das Verständnis der Regulation des menschlichen Cholesterinstoffwechsels gehabt hat, kann nicht

übersehen werden, daß dieser vererbbare LDL-Rezeptordefekt relativ selten, d.h. nur bei etwa 5 % der Patienten mit primärer Hypercholesterinämie, auftritt (117).

Daher war es nicht überraschend, daß zellulär fixierte Änderungen des LDL-Stoffwechsels in Fibroblasten von Typ I und Typ II-Diabetikern nicht nachzuweisen sind. Insbesondere unterscheiden sich Bindung und Metabolismus von LDL und HDL in den Diabetikerfibroblasten weder quantitativ noch qualitativ von denen normaler Fibroblasten und werden in ähnlicher Weise reguliert (z.B. Konfluenzabhängigkeit und LDL/HDL-Interaktion) (Abschnitt 3.1.2.1.) (148, 154, 181). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen anderer Autoren an Fibroblasten von Typ I-Diabetikern (41).

Bei den Untersuchungen zur Charakterisierung von Lipoproteinrezeptoren konnte in Übereinstimmung mit anderen Autoren in Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen verschiedener Spezies die Empfindlichkeit des LDL-Rezeptors gegenüber Proteasen, seine Regulation durch Sterole im Medium und die Abhängigkeit seiner Rekonstitution von einer ungestörten Proteinsynthese nachgewiesen werden (96, 149, 150). Das Fehlen dieser regulatorischen Einflüsse auf den LDL-Rezeptor in Fibroblasten von homozygoten Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie ist ein zusätzlicher Beleg für deren LDL-Rezeptordefekt (Abschnitt 3.1.2.1.).

Ein Effekt der verschiedenen Proteasen bzw. Sterole auf die HDL-Bindung fehlt dagegen in mesenchymalen Zellen. Dies weist eindeutig auf einen vom LDL-Rezeptor unabhängigen Bindungsmechanismus der HDL hin (Abschnitt 3.1.2.1.). Die Affinität von HDL zum LDL-Rezeptor ist auf den Apoprotein-E-Gehalt einer HDL-Fraktion zurückgeführt

worden (170-172, 211). Die Gleichartigkeit des LDL- und HDL-Stoffwechsels und deren Regulation in Hautfibroblasten und den arteriellen glatten Muskelzellen ist dabei ein zusätzlicher Beleg dafür, daß der Stoffwechsel in Hautfibroblasten als Modell für den Stoffwechsel verschiedener mesenchymaler Zellen in der Gefäßwand dienen kann (Abschnitt 3.1.2.).

Metabolisch bedingte Änderungen des Lipoproteinstoffwechsels in mesenchymalen menschlichen Zellen durch Faktoren aus Diabetikerserum sind bisher nicht von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden. Bekannt war nur, daß hohe Insulinkonzentrationen von 100 und 1000 µE/ml die LDL-Bindungskapazität gezüchteter Fibroblasten von Stoffwechselgesunden steigerten, während bei niedrigen Insulinkonzentrationen (10 µE/ml) in vitro keine besonderen Effekte auf die LDL-Bindung nachweisbar waren (43). Deshalb ist es unwahrscheinlich, daß die in 10 % Diabetikerserum enthaltene Endkonzentration von 2-3 µE Insulin/ml Inkubationsmedium die beobachtete Erhöhung der LDL-Bindungskapazität im Vergleich zu 1 µE Insulin/ml in 10 % Normalserum bewirkt hat.

Mit den vorliegenden Untersuchungen wurde erstmals belegt, daß Diabetikerserum den LDL- und HDL-Stoffwechsel in mesenchymalen Zellen im Vergleich zu Normalserum bis um 160% steigert, gemessen an Oberflächenbindung und intrazellulärer Metabolisierung dieser Lipoproteine. Dagegen wurde die Interaktion von LDL und HDL an der Oberfläche dieser Zellen durch Diabetikerserum nicht verändert (Abschnitt 3.2.1.3.).

Da diese Änderungen des Lipoproteinstoffwechsels wahrscheinlich mit der Wirkung des Diabetikerserum auf Cathepsin D im Zusammenhang stehen, soll der Pathomechanismus erst im folgenden Abschnitt

im Zusammenhang mit den metabolisch bedingten Änderungen von Proteasenaktivitäten diskutiert werden.

## 4.4. Änderungen von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidase in mesenchymalen Zellen

Zellulär fixierte Änderungen der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasenaktivität sind in Diabetikerfibroblasten im Vergleich zu Normalfibroblasten nicht nachweisbar (Abschnitt 3.1.3.) und bisher von anderen Arbeitsgruppen beim Diabetes nicht untersucht worden (113). Dagegen dokumentiert die im Vergleich zu Normalfibroblasten verminderte Cathepsin D- und Cathepsin B-Aktivität in Fibroblasten von Patienten mit familiärer Hyper-LDL, Hyper-HDL-Cholesterinämie und Hyper-VLDL-Triglyceridämie erstmals bei Patienten mit verschiedenen Formen einer familiären Hyperlipoproteinämie eine bisher unbekannte, zellulär fixierte Störung vor allem am Cathepsin D, dem Schlüsselenzym für den LDL-Abbau (190) (Abschnitt 3.1.3. und 3.2.3.2.).

Noch nicht ausreichend geklärt ist, ob die serumunabhängige Erniedrigung der Cathepsin D-Aktivität in mehreren Hyperlipämikerfibroblastenlinien Ausdruck eines besonderen genetischen Defektes bei verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien ist, oder ob es ähnlich den zellulär fixierten Änderungen der Wachstumseigenschaften erst unter der Einwirkung von Serumfaktoren zur verstärkten Selektion solcher Fibroblastenlinien kommt. Bei den bisher bekannt gewordenen vererbbaren zellulären Defektes an einzelnen lysosomalen Enzymen, die mit einem erhöhten atherogenen Risiko und einer verkürzten Lebensdauer einhergehen, handelt es sich um

relativ seltene Krankheiten, wie z.B. die I-Zellerkrankung, die Pseudo-Hurler-Dystrophie oder die Wolman'sche Krankheit (95, 213, 248, 296).

Das unterschiedliche pH-Optimum im in vitro-Test, die Empfindlichkeit gegenüber den spezifischen Proteaseninhibitoren Pepstatin und Leupeptin wie auch die umfangreichen Untersuchungen anderer Autoren zur intrazellulären Lokalisation dieser Proteasen (4, 13, 14, 162, 222), charakterisieren die Cathepsine D und B als lysosomale Enzyme und ordnen die Aminopeptidase der extralysosomalen Fraktion zu (165, 286).

Metabolisch bedingte Änderungen lysosomaler und extralysosomaler Enzymaktivitäten beim Typ I-Diabetes des Menschen und beim experimentell-induzierten tierischen Diabetes sowie bei Hypercholesterinämie sind unter verschiedenen Aspekten untersucht worden.

Eine Verminderung des LDL-Proteinabbaus ist in frisch aus dem Blut isolierten, mononukleären Zellen von insulinpflichtigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung beschrieben worden (125, 126). Der Wirkungsmechanismus blieb aber ungeklärt. Lysosomale Enzyme dieser Zellen (saure Cholesterinesterase, N-Acetyl-ß-glucosaminidase) waren in ihrer Aktivität deutlich vermindert (126). Aktivitätsänderungen von verschiedenen Glykosidasen, die am Abbau von Glykosaminoglykanen, Glykolipiden und Glykoproteinen beteiligt sind, wurden sowohl bei insulinbedürftigen Diabetikern als auch beim streptozotocin-induzierten Insulinmangeldiabetes der Ratte beobachtet (137, 212, 277). Dabei traten im Blut Erhöhungen der Aktivität von D-Glukuronidase, B-Galaktosidase und von N-Acetylglukosaminidase in Abhängigkeit vom Schweregrad der diabetischen Stoffwechsellage oder zusätzlich bei makro- oder

mikroangiopathischen Komplikationen auf (80, 178). Parallel dazu waren in einzelnen Studien diese Enzymaktivitäten im Urin und in der Leber erhöht, während im Nieren-und Hirngewebe deutlich erniedrigte Glykosidaseaktivitäten nachweisbar waren (137). Diese Änderungen sind in Beziehung zu Störungen im Glykoproteinstoffwechsel extrazellulärer Proteine der Basalmembran in Niere, Retina und der Arterienwand beim Diabetes, aber auch bei nicht-diabetischen arteriosklerotischen Erkrankungen gesetzt worden (136, 247).

Im Skelettmuskel der streptozotocin-diabetischen Ratte wurde ein ausgeprägter Anstieg der Aminopeptidasenaktivität beobachtet, der im Zusammenhang zum gesteigerten Proteinkatabolismus des Skelettmuskels beim Diabetes mellitus gestellt worden ist (53).

In der Arterienwand von Kaninchen und Ratten mit diätinduzierter Hypercholesterinämie waren die saure Cholesterinesteraseaktivität vermindert und gleichzeitig die Cholesterinestersynthese gesteigert, woraus eine vermehrte Akkumulation von Cholesterinestern resultierte (206, 243, 293).

Die Pathomechanismen der Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen Änderungen der Enzymaktivitäten in verschiedenen Organen sind weitgehend ungeklärt. Mehrtägige Therapie mit Insulin vermochte sowohl beim experimentellinduzierten tierischen Insulinmangeldiabetes als auch beim insulinbedürftigen Diabetes des Menschen mit schlechter Stoffwechseleinstellung die Aktivität verschiedener Proteasen sowie der sauren Cholesterinesterase zu steigern (125, 295). Ungeklärt ist aber, ob es sich dabei um eine direkte Insulinwirkung auf diese Enzyme oder um eine indirekte Wirkung über die Verbesserung der Stoffwechseleinstellung handelt.

Die bei einigen insulinpflichtigen Diabetikern erhöhten Blutspiegel der Proteaseninhibitoren Alpha-2-Makroglobulin oder Alpha-1-Antitrypsin sind ebenfalls in Beziehung zur verminderten Proteasenaktivität beim Abbau von Basalmembranen gesetzt worden (36). Beim nicht-insulinbedürftigen Typ II-Diabetiker fehlen vergleichbare Studien.

Unklar ist auch, ob cholesterinreiche LDL aus Hypercholesterinämikerserum, die bei chronischer Exposition in vitro zu intrazellulärer Cholesterinesterspeicherung und Zelldegeneration in arteriellen glatten Muskelzellen und Fibroblasten führt, auf lysosomale Proteasen eine besondere Wirkung ausübt.

Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte erstmals die unterschiedliche Wirkung extrazellulärer Faktoren im Serum von Typ II-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung auf die Aktivität lysosomaler und extralysomaler Proteasen in gezüchteten mesenchymalen Zellen nachgewiesen werden. Dabei wurde ein bisher unbekannter Effekt - die Verminderung der Cathepsin D-Aktivität durch Diabetikerserum - entdeckt, der unabhängig von genetisch bedingten LDL-Rezeptordefekten zu einer Verzögerung des LDL-Katabolismus in vivo und damit zu einer Hypercholesterinämie beitragen könnte. Der Verminderung der Cathepsin D-Aktivität um durchschnittlich 31-48 %, die unabhängig vom Zelltyp und der Zelldichte sowohl gegenüber dem klassischen in vitro-Testsubstrat Hämoglobin als auch gegenüber dem potentiell atherogenen LDL nachweisbar war, stehen keine signifikante Änderung der Cathepsin B-Aktivität und ein Anstieg der Aminopeptidasenaktivität um ca. 13-35 % gegenüber (Abschnitt 3.2.1.4.).

Außerdem konnte erstmals im Serum von Typ II-Diabetikern die Abhängigkeit der Faktoren, die diese Proteasen beeinflussen, von der jeweiligen Stoffwechseleinstellung demonstriert werden, da die Wirkung dieser Faktoren nur bei schlechter Stoffwechsellage nachweisbar ist und durch Verbesserung der Stoffwechseleinstellung normalisiert werden kann (Abschnitt 3.2.2.2.).

Die dem Diabetikerserum ähnliche Wirkung des Serums von Patienten mit Hypercholesterinämie auf die Cathepsin D-Aktivität mesenchymaler Zellen, die damit ebenfalls zum ersten Mal beschrieben wurde, ist ein Hinweis darauf, daß es sich dabei nicht um eine diabetesspezifische Serumwirkung handelt (Abschnitt 3.2.3.2.).

Die Verminderung der Cathepsin D-Aktivität mesenchymaler Zellen durch Diabetiker- und Hypercholesterinämikerserum und die Normalisierung der Cathepsin D-Aktivität nach Verbesserung der diabetischen Stoffwechseleinstellung steht im Einklang mit den o.g. parallelen Veränderungen anderer lysosomaler Hydrolasen der Arterienwand und von mononukleären Blutzellen beim Insulinmangeldiabetes verschiedener Spezies (176, 293, 294). Bisher ist aber ungeklärt, ob es sich dabei um einen gemeinsamen Wirkungsmechanismus für verschiedene lysosomale Enzyme handelt und ob die Serumfaktoren beim Typ I und Typ II-Diabetes identisch sind. Der Diabetikerserum-abhängige Anstieg der Aminopeptidasenaktivität in mesenchymalen Zellen hat eine Parallele im deutlich ausgeprägteren Anstieg der Aminopeptidasenaktivität des Skelettmuskels der streptozotocin-diabetischen Ratte (53, 54).

Die normalen Aktivitäten von Cathepsin D und Aminopeptidase in den untersuchten Diabetikerseren geben keine Hinweise auf Störungen dieser Enzymaktivitäten in vivo. Die

in vitro-Versuche mit kultivierten mesenchymalen Zellen belegen aber, daß die Diabetikerserum-abhängige Verminderung der intrazellulären Cathepsin D-Aktivität nicht durch eine vermehrte Abgabe des Enzyms aus der Zelle zustande kommt. Der parallele Anstieg der extra- und intrazellulären Aminopeptidasenaktivität zeigt aber gleichzeitig die Fähigkeit dieser Zellen, die Aktivität und extrazelluläre Abgabe verschiedener Proteasen in unterschiedlicher Weise zu regulieren. Die fehlende Wirkung des Diabetikerserums nach 4 Std. Zellexposition deutet auf längerfristige Änderungen im Zellstoffwechsel und spricht gegen kurzfristige Einflüsse auf die Proteasenaktivitäten. Detailliertere Untersuchungen zur Wirkungsweise der Diabetikerserumfraktion(en) auf diese Proteasen stehen aber noch aus.

Da die Seren von nicht-insulinbedürftigen Typ II-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung im Vergleich zu Seren von Stoffwechselgesunden um 2-3fach höhere Insulinkonzentrationen enthielten, scheidet ein Insulinmangel als ursächlicher Faktor für die Änderungen der Proteasenaktivität aus (221). Ebenso kann ein funktioneller Insulinmangel infolge eines Insulinrezeptordefektes nicht vorliegen, da diese Wirkung von Diabetikerserum

1. in gleicher Weise in kultivierten Fibroblasten von Diabetikern wie von Stoffwechselgesunden nachweisbar ist,
2. diese Diabetikerfibroblasten bereits bei Insulinkonzentrationen von 10 µE/ml mit Wachstumssteigerung reagieren, also insulinempfindlich sind und
3. bei Diabetikerfibroblasten auch von anderen Autoren Insulinrezeptordefekte nicht beschrieben worden sind.

Da die Serumkonzentrationen von Alpha-2-Makroglobulin und Alpha-1-Antitrypsin bei den untersuchten Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung wie auch bei den

Patienten mit primärer Hypercholesterinämie im Normbereich lagen, können die Proteaseneffekte auch nicht mit diesen Proteaseninhibitoren erklärt werden.

Die durch Diabetikerserum ausgelöste Aktivitätsänderung von Cathepsin D und Aminopeptidasen könnte auch im Zusammenhang mit den beschriebenen Änderungen des Wachstums, des Protein- wie Lipoproteinstoffwechsels stehen. Aus Untersuchungen zum mitogenen Effekt von epidermal growth factor auf mesenchymale Zellen verschiedener Spezies ist bekannt, daß eine Hemmung des lysosomalen Abbaus dieses Wachstumsfaktors zu einer Wachstumssteigerung führen kann (34, 240).

Eine Verminderung der Cathepsin D-Aktivität könnte demnach durch Abbauverzögerung von einem oder mehreren Wachstumsfaktoren oder auch indirekt von spezifischen Rezeptoren bzw. den Rezeptorsomen von Wachstumsfaktoren zu einer verlängerten, effektiven mitogenen Wirkung führen (236, 254).

Möglicherweise steht auch die Diabetikerserum-abhängige Erhöhung der LDL- und HDL-Bindungskapazität mesenchymaler Zellen mit einer gleichzeitigen Abbauverminderung von Lipoproteinrezeptoren im Zusammenhang, die eine verlängerte "Rezeptorlebenszeit" bedeuten könnte. Eine solche Konstellation - verlängerte "Rezeptorlebenszeit" mit der Folge einer erhöhten Rezeptorbindungskapazität für Lipoproteine und eine gleichzeitige Abbauverminderung für Lipoproteine (249) - würde auch im Einklang stehen mit der beobachteten Diabetikerserum-abhängigen Erhöhung des Quotienten von Lipoproteinbindung zu Lipoproteinmetabolisierung (Abschnitt 3.2.1.3.).
Dieses mit zunehmener Lipoproteinkonzentration steigende Mißverhältnis wäre damit der funktionelle Ausdruck für die Diabetikerserum-abhängige Entkoppelung von Lipoproteinbindung

und Metabolisierung. Damit verknüpft wäre die Annahme einer zusätzlichen Regulation für Lipoproteinrezeptoren in mesenchymalen Zellen in Abhängigkeit von der Cathepsin D-Aktivität.
Die gleichzeitige Verminderung der Cathepsin D-Aktivität und die Wachstumssteigerung mesenchymaler Zellen durch Serum von Patienten mit Hypercholesterinämie impliziert die Möglichkeit ähnlicher Konsequenzen der gegenseitigen Beeinflussung, wie sie bereits für die Wirkungen von Diabetikerserum diskutiert wurden. Die Gleichartigkeit der zellulären Reaktion auf Seren von unterschiedlichen Stoffwechselstörungen könnte im Einklang mit der Annahme stehen, daß die Kopplung von Wachstumssteigerung und Verminderung des Proteinabbaus ein generelles Regulationsprinzip des Stoffwechsels mesenchymaler Zellen darstellt, dessen Rolle in der Ökonomisierung des Proteinstoffwechsels bei der Zellproliferation liegen könnte. Die besonders pathogene Wirkung des Serums von Diabetikern oder Patienten mit Hypercholesterinämie auf mesenchymale Zellen in der Gefäßwand würde danach in der langfristigen Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen wenigen proliferierenden und vielen nicht-proliferierenden Zellen in Richtung eines erhöhten Anteils proliferierender Zellen liegen. Die unter physiologischen Bedingungen möglicherweise sinnvolle Koppelung von Wachstumssteigerung, erhöhter Proteinsynthese und Vermehrung der Rezeptorenzahl der für das Zellwachstum benötigten extrazellulären Faktoren mit einer Verminderung des Proteinabbaus könnte bei chronischer Überstimulation zu vermehrtem Zellumsatz, der vermehrten extrazellulären Ablagerung von Proteinen und Lipiden führen, wie sie in typischer Weise für die Angiopathien beim Diabetes mellitus oder bei primären Hyperlipoproteinämien beschrieben worden sind.

## 5. Zusammenfassung

Die Pathogenese des Diabetes mellitus und der Hyperlipoproteinämien sowie ihrer angiopathischen Spätkomplikationen ist wegen der vielfältigen Ursachen und klinischen Erscheinungsformen nur unvollkommen bekannt. Die Kombination von Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie ist von großer klinischer Bedeutung. Dadurch wird das bereits für den Diabetes allein erhöhte angiopathische Risiko weiter gesteigert. Zur Klärung der Ursachen für Prädisposition und Entwicklung der Arteriosklerose bei Diabetes mellitus wie Hyperlipoproteinämie wurden mesenchymale Zellen von Diabetikern, Hyperlipämikern und Stoffwechselgesunden auf ihre Wachstumseigenschaften und auf Veränderungen des Protein- und Lipoproteinstoffwechsels unter Zellkulturbedingungen untersucht, da deren detaillierte Analyse in vivo nur begrenzt möglich ist. Im einzelnen wurden folgende Fragen geprüft:

1. Liegen zellgebundene Änderungen
   a) des Wachstums,
   b) des Lipoproteinstoffwechsels und
   c) der Ausstattung mit lysosomalen und extralysosomalen Proteasen in mesenchymalen Zellen von Diabetikern und Hyperlipämikern vor, die in der Zellkultur persistieren und mit Änderungen des Zellstoffwechsels einhergehen ?
2. Existieren im Blutserum Veränderungen von Molekülen bei Diabetikern und Hyperlipämikern im Vergleich zu Stoffwechselgesunden, die
   a) das Wachstum,
   b) die Proteinsynthese,
   c) den LDL- und HDL-Stoffwechsels sowie
   d) lysosomale und extralysosomale Proteasen dieser Zellen krankheitsspezifisch beeinflussen können ?

3. Welche Aussage ist über die Natur solcher Moleküle möglich ?
4. Wie wirken sich die Interaktionen der unter 1. und 2. genannten zellulären und extrazellulären Faktoren auf den Zellstoffwechsel in vitro aus, und können diese Faktoren im Zusammenhang mit angiopathischen Veränderungen in vivo gebracht werden ?

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt an in der 2. bis 10. Passage gezüchteten Zellinien von
1. arteriellen glatten Muskelzellen von zwei nicht-diabetischen Patienten und 3 Hampshire- bzw. Duroc-Schweinen und
2. Hautfibroblasten von 12 Diabetikern mit verschiedenen Diabetestypen (3 insulinbedürftige sowie 4 nicht insulinbedürftige Diabetiker mit familiärer Belastung; 5 insulinbedürftige pankreatektomierte Diabetiker ohne familiäre Diabetesbelastung), von 13 Hyperlipämikern mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien (4 Patienten mit Hyper-LDL-Cholesterinämie, 4 Patienten mit Hyper-HDL-Cholesterinämie, 3 Patienten mit Hyper-VLDL-Triglyceridämie und 2 Patienten mit Typ III-Hyperlipoproteinämie nach Fredrickson) im Vergleich zu 8 Stoffwechselgesunden aus patientengleichen Altersbereichen (Tab. 4-8).

Dabei wurden folgende Seren auf ihre Stoffwechselwirkung in vitro und auf spezifische Faktoren analysiert:
1. 16 Mischseren von nicht-insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung ohne Ketose,
2. 5 Mischseren von nicht-insulinbedürftigen Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung,
3. Einzelseren von 4 nicht-insulinbedürftigen Diabetikern bei schlechter und guter Stoffwechseleinstellung,
4. 11 Mischseren von primären Hypercholesterinämikern und
5. 14 Mischseren von Stoffwechselgesunden (Tab. 1-3).

zu 1a) Zellulär fixierte Änderungen des Wachstums (Abschnitt 3.1.1.) sind sowohl in Fibroblasten von Diabetikern als auch von Hyperlipämikern nachweisbar. Das Fibroblastenwachstum von Patienten mit primärem Typ I-, Typ II-Diabetes mellitus und pankreatektomierten Patienten mit sekundärem Diabetes mellitus, deren Stoffwechsel über 1-5 Jahre seit der Diabetesmanifestation schlecht eingestellt war, ist im Vergleich zum Fibroblastenwachstum altersgleicher Stoffwechselgesunder (NF) bei allen 3 Diabetestypen in gleicher Weise um 15-92 % gesteigert. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich das Fibroblastenwachstum eines Typ II- und eines pankreatektomierten Diabetikers, deren Stoffwechsellage über 2-3 1/2 Jahre seit der Diabetesmanifestation optimal eingestellt war, nicht vom NF-Wachstum.

Damit konnte erstmals unter kontrollierten in vitro-Bedingungen eine zellulär fixierte Steigerung der Wachstumsfähigkeit mesenchymaler Zellen beim primären Typ I- und Typ II-Diabetes mellitus und beim sekundären Diabetes mellitus des Menschen nachgewiesen werden, die in Abhängigkeit vom Ausmaß der Stoffwechselstörung in vivo manifest wird.

Das Fibroblastenwachstum von primären Hyperlipämikern mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämie, deren Lipoproteinstoffwechsel mindestens über 6-19 Jahre seit Diagnose gestört und durch die Therapie nicht normalisiert worden war, ist im Vergleich zum NF-Wachstum um 9-83 % vermindert. Dagegen ist das Fibroblastenwachstum eines 11-jährigen Patienten mit Hyper-HDL-Cholesterinämie, dessen Stoffwechselstörung erst seit einem Jahr bekannt war, um 10-15 % im Vergleich zum NF-Wachstum gesteigert. Diese zellulär fixierte Verminderung der Wachstumsfähigkeit mesenchymaler Zellen nach langjähriger Hyperlipoproteinämiedauer ist bisher noch nicht beim Menschen beschrieben worden.

zu 1b) Zellulär fixierte Störungen des Lipoproteinstoffwechsels (Abschnitt 3.1.2.) sind in den 4 Fibroblastenlinien von familiär homozygoten Hypercholesterinämikern (LDL-Rezeptormangel), dagegen nicht in Diabetikerfibroblasten oder den arteriellen glatten Muskelzellinien nachweisbar. Die LDL/HDL-Interaktionen bei der Lipoproteinbindung an die Zelloberfläche unterschieden sich nicht zwischen NF und Diabetikerfibroblasten. Die Regulation des LDL-Rezeptors durch Sterole erfolgt in NF wie in arteriellen glatten Muskelzellen verschiedener Spezies in gleicher Weise. Im Gegensatz dazu wird die HDL-Bindung in diesen mesenchymalen Zellen nicht durch Sterole reguliert und durch Proteasen nicht vermindert.

zu 1c) Zellulär fixierte Änderungen der Cathepsin D-, Cathepsin B- oder Aminopeptidasenaktivität (Abschnitt 3.1.3.) sind in Diabetikerfibroblasten im Vergleich zu NF nicht nachweisbar. Dagegen war die Cathepsin D- und Cathepsin-B-Aktivität pro µg DNS in Fibroblasten von Patienten mit familiärer Hyper-LDL-, Hyper-HDL-Cholesterinämie und Hyper-VLDL-Triglyceridämie um ca. 12-31 % bzw. um ca. 9-14% im Vergleich zu NF der gleichen Altersstufe vermindert. Diese Befunde dokumentieren erstmals bei Patienten mit verschiedenen Formen einer familiären Hyperlipoproteinämie eine bisher unbekannte, zellulär fixierte Störung vor allem am Cathepsin D, dem Schlüsselenzym für den LDL-Abbau in mesenchymalen Zellen.

zu 2a) Einflüsse von Serumfaktoren auf das Wachstum (Abschnitt 3.2.1.) Mischseren von Typ II-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS) (DME + 10 % DS) stimulierten das Wachstum aller Diabetiker-, Normal- und Hypertriglyceridämiker-Fibroblasten und menschlicher arterieller glatter Muskelzellen zusätzlich um 6-64 % (Mittelwert: 27 %) im Vergleich zu Mischseren von Stoff-

wechselgesunden (NS). Dabei kann sich der zusätzliche wachstumssteigernde Effekt dieser DS während aller Wachstumsphasen unabhängig vom Wachstumstyp als Mono- oder Multilayer bis zum Konfluenzstadium auswirken.

Einzelseren von Typ II-Diabetikern steigerten ebenfalls das Zellwachstum zusätzlich um 8-48 % (Mittelwert: 29 %) im Vergleich zu Einzelseren der gleichen Diabetiker, deren Stoffwechseleinstellung nach 3-5wöchiger Behandlung deutlich verbessert wurde (Abschnitt 3.2.2.1.). Im Vergleich zu NS ist kein Unterschied der wachstumsstimulierenden Wirkung von Mischseren von Typ II-Diabetikern mit optimaler Stoffwechseleinstellung (DS+) mehr nachweisbar.

Diese besondere wachstumsstimulierende DS-Wirkung objektiviert erstmals beim Typ II-Diabetes des Menschen die Existenz zusätzlicher Wachstumsfaktoren, die nur bei schlechter Stoffwechseleinstellung nachweisbar sind und deren Wirkung durch Verbesserung der Stoffwechsellage normalisiert werden kann.

Mischseren von Hypercholesterinämikern (HS) stimulierten das Wachstum aller Hyperlipämiker- und Normalfibroblasten sowie von Diabetikerfibroblasten zusätzlich um 8-49 % (Mittelwert: 27 %) im Vergleich zu NS (Abschnitt 3.2.3.1.). Ähnlich wie beim DS kann sich der zusätzliche wachstumssteigernde Effekt dieser HS während aller Wachstumsphasen unabhängig vom Wachstumstyp als Mono- oder Multilayer bis zum Konfluenzstadium auswirken.

zu 2b) Einflüsse von Serumfaktoren auf die Proteinsynthese (Abschnitt 3.2.1.2.) DS steigerte die Proteinsynthese gemessen am $^{14}$C-Leucin- bzw. $^{14}$C-Prolineinbau in zellständige Proteine nach 20 Stunden um 33 % bzw. 36 % im Vergleich zum NS. Dagegen fand sich kein Unterschied der DS- und NS-

Wirkung auf den Einbau dieser Aminosäuren in extrazellulär abgegebene Proteine. Dabei nimmt mit zunehmender Zelldichte der Einbau dieser Aminosäuren in Proteine pro Zelle unabhängig vom Zelltyp linear ab.

zu 2c) Einflüsse von Serumfaktoren auf den Lipoproteinstoffwechsel (Abschnitt 3.2.1.3.)
DS steigert den LDL- und HDL-Stoffwechsel zelltypunabhängig bis um 160 % im Vergleich zu NS gemessen an der LDL- bzw. HDL-Oberflächenbindung und deren nachfolgenden intrazellulären Metabolisierung im Bereich von 1-100 µg $^{125}$J-LDL- bzw. HDL-Protein pro ml. Dabei metabolisieren die mit DS gezüchteten Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen mit zunehmender extrazellulärer Lipoproteinkonzentration 20-50 % weniger von der an die Zelloberfläche gebundenen Lipoproteinmenge als mit NS gezüchtete Zellen. Dagegen wird die Interaktion von LDL und HDL an der Oberfläche mesenchymaler Zellen durch DS nicht verändert.

zu 2d) Einflüsse von Serumfaktoren auf lysosomale und extralysosomale Proteasen (Abschnitt 3.2.1.4.)
DS beeinflußt die intrazelluläre Aktivität lysosomaler und extralysosomaler Proteasen in unterschiedlicher Weise im Vergleich zu NS und DS+. DS erniedrigt die Cathepsin D-Aktivität gemessen am $^{14}$C-Hämoglobinabbau zelltypunabhängig in Diabetiker- und Normalfibroblasten um durchschnittlich 31-48 %. DS erniedrigt ebenfalls die Cathepsin D-Aktivität, gemessen am Abbau von $^{125}$J-LDL in deren physiologischem Konzentrationsbereich zelltypunabhängig in Diabetiker- und Normalfibroblasten um durchschnittlich 24-39 % und in arteriellen glatten Muskelzellen um durchschnittlich 16 %. DS zeigt keine Wirkung auf die Cathepsin B-Aktivität in Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen gemessen am N-alpha-Benzoyl-DL-Arginin-ß-Naphtylamid-Abbau. DS erhöht die Aminopeptidasenaktivität in Diabetiker-

und Normalfibroblasten um ca. 13-35 % gemessen am Leucin-p-nitroanilidabbau und bleibt ohne erkennbaren Einfluß in arteriellen glatten Muskelzellen.

Dagegen ist kein Unterschied der Wirkung von DS+ im Vergleich zu NS auf die Cathepsin D- und Aminopeptidasenaktivität von Diabetiker- und Normalfibroblasten sowie von arteriellen glatten Muskelzellen mehr nachweisbar.

HS erniedrigt im Vergleich zu NS die intrazelluläre Cathepsin D-Aktivität gemessen am $^{14}$C-Hämoglobinabbau zelltypunabhängig in allen Hyperlipämiker- und Normalfibroblasten um durchschnittlich 25-44 %, während es keine Wirkung auf die Cathepsin B- und Aminopeptidasenaktivität zeigt (Abschnitt 3.2.3.2.). HS erniedrigt im Vergleich zu NS ebenfalls die Cathepsin D-Aktivität gemessen am Abbau von $^{125}$J-LDL in deren physiologischem Konzentrationsbereich zelltypunabhängig in Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen um durchschnittlich 29-42 %.

Damit konnten erstmals mehrere DS-abhängige Störungsmöglichkeiten mit unterschiedlichen Angriffspunkten im Stoffwechsel menschlicher mesenchymaler Zellen nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde ein bisher unbekannter Mechanismus - die Verminderung der intrazellulären Cathepsin D-Aktivität durch DS wie HS - entdeckt, der unabhängig von genetisch bedingten LDL-Rezeptordefekten zu einer Verzögerung des LDL-Katabolismus in vitro und damit zu einer Hypercholesterinämie beitragen könnte. Diese besondere Serumwirkung auf Proteasen objektiviert erstmals beim Typ II-Diabetes des Menschen die Existenz zusätzlicher Faktoren im Serum, deren Wirkung a) nur bei schlechter Stoffwechseleinstellung nachweisbar ist und b) durch Verbesserung der Stoffwechsellage normalisiert werden kann.

zu 3) Charakterisierung der Wachstumsfaktoren in DS
(Abschnitt 3.3.)
Die Analyse der DS auf potentielle Wachstumsfaktoren für mesenchymale Zellen ergab, daß im Vergleich zu NS die Serumkonzentrationen von Insulin, Glukose und Triglyceriden um das 2-3fache erhöht waren. Dagegen lagen die Serumspiegel von Gesamtcholesterin, Insulin-like-growth-factor I und II sowie von Wachstumshormon innerhalb des Normbereiches.

Insulin (10 bzw. 100 µE/ml) steigert zwar das Zellwachstum, vermag aber trotz 30-50 x höherer Konzentration nicht den Wachstumseffekt von DME + 10 % DS (2-3 µE Insulin/ml) zu erreichen. Ein wachstumsstimulierender Effekt der Glukose ist nicht nachweisbar. Eine Erhöhung der Glukoseendkonzentration im Inkubationsmedium auf 400 mg/dl verringert sogar serumunabhängig das Fibroblastenwachstum.

Die zusätzliche wachstumsstimulierende Wirkung auf mesenchymale Zellen ist in der DS-Fraktion enthalten, die mit Spectrapor 6-Membranen (molekulare Ausschlußgrenze 1000 Daltons) herausdialysiert werden kann. Diese niedermolekulare DS-Fraktion hat allein keinen Wachstumseffekt mehr auf Fibroblasten. Im Gegensatz dazu besitzt die dialysierte DS-Fraktion noch eine wachstumsteigernde Wirkung, deren Ausmaß sich aber nicht mehr vom Wachstumseffekt des NS unterscheidet. Ein Dialyseeffekt auf die Wachstumswirkung des NS war nicht nachweisbar. Die Kombination der niedermolekularen DS-Fraktion mit dialysiertem DS wie NS bewirkt eine zusätzliche Wachstumssteigerung auf das mit DS erreichte Ausmaß. Die wachstumsfördernde Kofaktor-Eigenschaft der höhermolekularen Serumfraktion ist insoweit diabetesunspezifisch.

Die niedermolekulare DS-Fraktion behält verlustlos die wachstumsstimulierende Wirkung nach 30 Min. bei 56°C, bis zu 8 Wochen bei -20°C, nach Lyophilisation und ist stabil bei pH 1-12. Die wachstumsstimulierende Wirkung dieser DS-Fraktion ist abhängig vom Zusammenwirken hydrophober und hydrophiler Anteile. Mehrstündige Inkubation mit Proteasen führt nicht zu einem Verlust der Wachstumswirkung.

Der Nachweis dieser zusätzlichen Wachstumsfaktoren im Serum von Typ II-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung erweitert das bisher bekannte Spektrum vermehrter Konzentrationen von höhermolekularen Wachstumsfaktoren im Serum von Typ I-Diabetikern in einen neuen, bisher unbekannten niedermolekularen Bereich.

zu 4) Bedeutung der zellulären und extrazellulären Faktoren

Die Bedeutung der zellulär fixierten und vererbbaren Änderungen von Wachstumseigenschaften liegt in ihrer Beziehung zur Zellalterung. Die Erhöhung und das vorzeitige Auftreten des angiopathischen Risikos und der Arteriosklerose bei Diabetes mellitus und den primären Hyperlipoproteinämien, die mit einer verkürzten Lebensdauer einhergehen, ist als ein Ausdruck der vorzeitigen Alterung von mesenchymalen Arterienwandzellen zu deuten. Dabei wird die fokal gesteigerte Proliferation arterieller glatter Muskelzellen als ein Schlüsselelement in der Frühphase der Atherogenese angesehen. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse stehen im Einklang mit folgender Hypothese: Zusätzliche Wachstumsfaktoren im Blut von Diabetikern oder Hyperlipoproteinämikern führen in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer zu einer Selektion mesenchymaler Zellen mit einer erhöhten Wachstumsbereitschaft gegenüber diesen Faktoren. Eine solche Selektion bei Diabetikern und Hyperlipämikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung

über relativ kurze Zeit könnte das unabhängig vom Diabetestyp gesteigerte Wachstumsverhalten der mesenchymalen Zellen erklären. Gleichzeitig würde ein vermehrter Zellumsatz, z.B. unter dem Einfluß von HS, zu einer geringeren Teilungsfähigkeit der verbleibenden Zellpopulation der verschiedenen Hyperlipämiker, deren Hyperlipoproteinämie über sehr lange Zeiträume bestand, führen. Die limitierte Verdopplungskapazität prädisponierter Zellen würde zwar anfangs stimuliert, aber damit auch vorzeitig erschöpft.

Dies würde auch im Einklang stehen mit dem unveränderten Wachstumsverhalten der mesenchymalen Zellen von Diabetikern mit optimaler Stoffwechseleinstellung seit Erkrankungsbeginn, da deren Seren keine zusätzlichen das Zellwachstum stimulierende Faktoren enthalten. Diese Befunde belegen außerdem die Möglichkeit, mit einer dauerhaften Normalisierung der diabetischen Stoffwechseleinstellung ein potentielles angiopathisches Risiko zu vermindern.

Das sehr niedrige Molekulargewicht der das Wachstum zusätzlich stimulierenden DS-Fraktion könnte die Infiltration in das Gewebe, z.B. in die Gefäßwand, im Vergleich zu höhermolekularen Substanzen erleichtern. Dadurch allein würde zwar das Zellwachstum noch nicht erhöht, aber es könnte in diesen Zellen eine erhöhte Ansprechbarkeit gegenüber anderen extrazellulären Faktoren geschaffen werden, die sich nicht nur auf das Wachstum sondern auch auf den Protein- und Lipoproteinstoffwechsel auswirkt. Damit im Einklang stehen in vitro

1. die gesteigerte Proteinsynthese bei gleichzeitiger Verminderung der Cathepsin D-Aktivität und
2. die erhöhte LDL-Oberflächenbindung bei paralleler Verringerung des intrazellulären LDL-Abbaus.

Die Gleichartigkeit der zellulären Reaktionen in vitro auf Seren von unterschiedlichen Stoffwechselstörungen weist darauf hin, daß die Koppelung von Wachstumssteigerung und Verminderung des Protein- und Lipoproteinabbaus ein generelles Regulationsprinzip des Stoffwechsels mesenchymaler Zellen darstellt. Die unter physiologischen Bedingungen sinnvolle Koppelung von Wachstumssteigerung, erhöhter Synthese verschiedener Proteine und Vermehrung der LDL-Rezeptoren mit einer gezielten Verminderung des Proteinabbaus könnte in vivo bei chronischer Überstimulation durch DS oder HS a) zu vermehrtem Zellumsatz und -untergang und b) zur vermehrten Ablagerung von Proteinen und Lipiden in verschiedenen Geweben einschließlich der Gefäßwand führen, wie sie in typischer Weise bei den Angiopathien des Diabetes mellitus und der primären Hyperlipoproteinämien auftreten.

Die Kombination 1) der o.g. zellulär fixierten Änderungen mit 2) den o.g. Wirkungen von Faktoren aus DS oder HS verstärkt in mesenchymalen Zellen von Diabetikern und Hyperlipämikern die Störungen im Bereich des Wachstums, Lipoproteinstoffwechsels und der Proteasen und könnte in der Arterienwand von entscheidender Bedeutung für das hohe atherogene Erkrankungsrisiko dieser beiden weit verbreiteten Stoffwechselstörungen sein.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Adams, C.W.M., Bayliss, O.B.: Detection of macrophages in atherosclerotic lesions with cytochrome oxidase. Br. J. Exp. Pathol. 57, 30 (1976)

2. Aizawa, S., Mitsui, Y., Kurimoto, F.: Cell surface changes accompanying aging in human diploid fibroblasts. Exp. Cell Res. 125, 287 (1980)

3. Alam, S.S., Solen, K.A., Layman, D.L., Riddle, M.C., Connor, W.E.: The mass uptake of cholesterol ester from low density lipoproteins by cultured smooth muscle and adventitial cells of human aortas. Circ. Res. 47, 374 (1980)

4. Amenta, J.S., Sargus, M.J., Venkatesan, S., Shinozuka, H.: Role of the vacuolar apparatus in augmented protein degradation in cultured fibroblasts. J. Cell Physiol. 94, 77 (1978)

5. Anderson, W.B., Jaworski, C., Pinkett, O.: Protease regulation of hormonal responsiveness in cultured fibroblasts. In: Proteases and hormones, M.K. Agarwal (ed.) 201 (1979), Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

6. de Asua, L.J., Richmond, K.M.V., Otto, A.M.: Two growth factors and two hormones regulate initiation of DNA synthesis in cultured mouse cells through different pathways of events. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1004 (1981)

7. Attie, A.D., Weinstein, D.B., Freeze, H.H., Pittmann, R.C., Steinberg, D.: Unaltered catabolism of desialylated low-density lipoprotein in the pig and in cultured rat hepatocytes. Biochem. J. 180, 954 (1979)

8. Bailey, J.M., Wu, J.D.: Lipid metabolism in cultured cells XVI. Lipoprotein binding and HMG CoA reductase levels in normal and tumor virus-transformed human fibroblasts. J. Lipid Res. 18, 512 (1977)

9. Bailey, J.W., Makheja, A.N., Butler, J., Salata, K.: Anti-inflammatory drugs in experimental atherosclerosis. Atherosclerosis 32, 195 (1979)

10. Balasubramaniam, S., Goldstein, J.L., Faust, J.R., Brown, M.S.: Evidence for regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesterol synthesis in nonhepatic tissues of rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2564 (1976)

11. Barill, M.F.: General principles of isolation and detection of mycoplasmas. INSERM 33, 135 (1974)

12. Barkley, D.S., Hardiwidjaja, S., Menkes, J.H.: Abnormalities in growth of skin fibroblasts of patients with Huntington's disease. Ann. Neurol. 1, 426 (1977)

13. Barret, A.J.: Cathepsin B and other thiol proteinases. In: Proteinases in Mammalian Cells and Tissues, A.J. Barrett (edit.) 181 (1977) Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

14. Barret, A.J.: Cathepsin D and other carboxyl proteinases. In: Proteinases in Mammalian Cells and Tissues, A.J. Barrett (edit.), 210 (1977) Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

15. Basu, S.K., Anderson, R.G.W., Goldstein, J.L. Brown, M.S.: Metabolism of cationized lipoproteins by human fibroblasts. J. Cell Biol. 74, 119 (1977)

16. Basu, S.K., Brown, M.S., Ho, Y.K., Goldstein, J.L.: Degradation of low density lipoprotein-dextran sulfate complex associated with deposition of cholesteryl esters in mouse macrophages. J. Biol. Chem. 245, 7141 (1979)

17. Bates,S.R.: Phospholipid metabolism of monkey smooth muscle cells grown in hyperlipemic serum. Biochim. Biophys. Acta 530, 175 (1978)

18. Bates, S.R.: Accumulation and loss of cholesterol esters in monkey arterial smooth muscle cells exposed to normal and hyperlipemic serum lipoproteins. Atherosclerosis 32, 165 (1979)

19. Baudet, M.F., Dachet, C., Beaumont, J.L.: In vitro interaction of LDL, antilipoprotein IgA and human fibroblasts. Biomedicine 29, 217 (1978)

20. Baumgartner, H.R.: Zur Pathogenese der Atherosklerose. Beitrag aus zellbiologischer Sicht. Schweiz. Med. Wochenschr. 107, 717 (1977)

21. Benditt, E.P., Benditt, J.M.: Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1753 (1973)

22. Berhanu, P., Olefsky, J.M.: Effects of insulin and insulin-like agents on the glucose transport system of cultured human fibroblasts. Diabetes 30, 523 (1981)

23. Biermann, E.L., Stein, O., Stein, Y.: Lipoprotein uptake and metabolism by rat aortic smooth muscle cells in tissue culture. Circ. Res. 35, 136 (1974)

24. Biermann, E.L., Albers, J.J.: Lipoprotein uptake and degradation of human aterial smooth muscle cells in tissue culture. Ann. NY. Acad. Sci. 275, 199 (1976)

25. Biermann, E.L., Albers, J.J., Chait, A.: Effect of donor age on the binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human arterial smooth muscle cells. J. Gerontol. 34, 483 (1979)

26. Bowersox, J.C., Sorgente, N.: Cells from spontaneously diabetic wistar ("BB") rats have altered growth rates and protein turnover. J. Cell Biol. 83, 98a (1979)

27. Bremer, G., Richter, O., Jacobi, E., Koschinsky, T.: The influence of microangiopathy in diabetics with antiplatelet drugs. Thrombos. Haemostas, 46, 58 (1981)

28. Brown, M.S., Goldstein, J.L.: Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibiton of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. J. Biol. Chem. 249, 7306 (1974)

29. Brown, M.S., Goldstein, J.L.: Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. Cell 6, 307 (1975)

30. Brown, M.S., Goldstein, J.L.: New directions in human biochemical genetics: understanding the manifestations of receptor deficiency states. Prog. Med. Genet. 1, 103 (1976)

31. Brown, M.S., Goldstein, J.L., Vandenberghe, K., Fryns, J.P., Kovanen, P.T., Eckels, R., v. d. Berghe, H., Cassiman, J.J.: Prenatal diagnosis of homozygous familial hypercholesterolemia. Lancet 1, 526 (1978)

32. Brown, M.S., Goldstein, J.L., Krieger, M., Ho, Y.K., Anderson, R.G.W.: Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. J. Cell Biol. 82, 597 (1979)

33. Brown, M.S., Goldstein, J.L.: Receptor-mediated endocytosis: Insights from the lipoprotein receptor system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3330 (1979)

34. Brown, K.D., Friedkin, M., Rozengurt, E.: Colchicine inhibits epidermal growth factor degradation in 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 480 (1980)

35. Brown, W.J., Sgoutas, D.S.: Purification of rat liver lysosomal cholesteryl ester hydrolase. Biochim. Biophys. Acta 617, 305 (1980)

36. Brownlee, M.: Alpha$_2$-macroglobulin and reduced basement-membrane degradation in diabetes. Lancet 1, 779 (1976)

37. Carew, T.E., Koschinsky, T., Steinberg, D.: Binding of low density lipoprotein (LDL) to pig smooth muscle cells (SMC) at 0°. Circulation 51/52 Suppl. II-59 (1975)

38. Carew, T.E., Koschinsky, T., Hayes, S.B., Steinberg, D.: A mechanism by which high-density lipoprotein may slow the atherogenic process. Lancet 1, 1315 (1976)

39. Castellot, J.J., Karnovsky, M.J., Spiegelman, B.M.: Potent stimulation of vascular endothelial cell growth by differentiated 3T3 adipocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6007 (1980)

40. Chait, A., Biermann, E.L., Albers, J.J.: Regulatory role of insulin in the degradation of low density lipoprotein by cultured human skin fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta 529, 292 (1978)

41. Chait, A., Biermann, E.L., Albers, J.J.: Low density lipoprotein receptor activity in fibroblasts cultured from diabetic donors. Diabetes 28, 914 (1979)

42. Chait, A., Ross, R., Albers, J.J., Bierman, E.L.: Platelet derived growth factor stimulates activity of low density lipoprotein receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4084 (1980)

43. Chait, A., Biermann, E.L., Albers, J.J.: Low density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts. Mechanism of insulin-induced stimulation. J. Clin. Invest. 64, 1309 (1979)

44. Chait, A., Miller, D.G., Bierman, E.L.: Insulin enhances low density lipoprotein catabolism in vivo. Diabetes 29, (Suppl. 2) 96A (1980)

45. Chatterjee, S., Kwiterovich, P.O., Sekerke, C.S.: Effects of tunicamycin on the binding and degradation of low density lipoproteins and glycoprotein synthesis in cultured human fibroblasts. J. Biol. Chem. 254, 3704 (1979)

46. Cheng, R.M., Fisher-Dzoga, K.: Effect of hyperlipemic serum lipoproteins on the lipid accumulation and cholesterol flux of rabbit aortic medial cells. Atherosclerosis 28, 339 (1977)

47. Cheng, S.-Y., Maxfield, F.R., Robbins, J., Willingham, M.C., Pastan, I.H.: Receptor-mediated uptake of 3,3', 5-triiodo-L-thyronine by cultured fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3425 (1980)

48. Cheung, H.S., Machina, T., Nimni, M.E.: Fibroblast insulin receptors in necrobiosis lipoidica diabeticorum. Diabetes (Suppl.), 470 (1978)

49. Clemmons, D.R., van Wyk, J.J., Pledger, W.J.: Sequential addition of platelet factor and plasma to BALB/c 3T3 fibroblast cultures stimulates somatomedin-C binding early in cell cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6644 (1980)

50. Coetzee, G.A., Stein, O., Stein, Y.: Uptake and degradation of low density lipoproteins (LDL) by confluent, contact-inhibited bovine and human enothelial cells exposed to physiological concentration of LDL. Atherosclerosis 33, 425 (1979)

51. Comings, D.E., Okada, T.A.: Electron microscopy of human fibroblasts in tissue culture during logarithmic and confluent stages of growth. Exptl. Cell Res. 61, 295 (1970)

52. Cooper, J.T., Goldstein, S.: Comparative studies on human skin fibroblasts: Life span and lipid metabolism in medium containing fetal bovine or human serum. In Vitro 13, 473 (1977)

53. Dahlmann, B., Schroeter, C., Herbertz, L., Reinauer, H.: Myofibrillar protein degradation and muscle proteinases in normal and diabetic rats. Biochem. Med. 21, 33 (1979)

54. Dahlmann, B., Reinauer, H.: Purification and some properties of an alkaline proteinase from rat skeletal muscle. Biochem. J. 171, 803 (1978)

55. Daughaday, W.H., Herington, A.C., Phillips, L.S.: The regulation of growth by endocrines. Ann. Rev. Physiol. 37, 211 (1975)

56. Davies, R.L., Grosse, W.A., Kucherlapati, R., Bothwell, M.: Genetic analysis of epidermal growth factor action: Assignment of human epidermal growth factor receptor gene to chromosome 7. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4188 (1980)

57. Day, A.J., Sheers, M.: Synthesis and removal of different cholesterol esters by aortic smooth muscle cells in culture. Atherosclerosis 26, 483 (1977)

58. Dénes, R., Mey, J., Lehmann, R., Hauss, W.H.: Vascular smooth muscle cells in culture after experimental diabetes. In: State of prevention and therapy in human arteriosclerosis and in animal models. Abh. Rhein.-Westf. Akademie der Wissenschaften 63, 249, Westdeutscher Verlag, Opladen (1978)

59. DiScala, V.A., Salomon, M., Grishman, E., Churg, J.: Renal structure in myxedema, Arch. Pathol. 84, 474 (1967)

60. Duhault, J., Bure, J., Lonchampt, M., Beert, L., Boulanger, M.: Variations of biosynthesis in endothelial cells cultured in normal and abnormal conditions related to diabetes. In: Cellular and Biochemical Aspects in Diabetic Retinopathy. Inserm Symposium No 7, Regnault, F., Duhault, J. (eds.), 15 (1978), Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

61. Dulbecco, R., Freeman, G.: Plaque production by the polyoma virus, Virology 8, 396 (1959)

62. Dulbecco, R., Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. Exp. Med. 99, 167 (1960)

63. Elmore, E., Swift, M.: Growth of human skin fibroblasts in dialyzed fetal bovine serum. In Vitro 13, 837 (1977)

64. Faust, J.R., Goldstein, J.L., Brown, M.S.: Squalene synthetase activity in human fibroblasts: Regulation via the low density lipoprotein receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5018 (1979)

65. Filipovic, I., Buddecke, E.: Desialized low-density lipoprotein regulates cholesterol metabolism in receptor-deficient fibroblasts. Eur. J. Biochem. 101, 119 (1979)

66. Filipovic, I., Buddecke, E.: Role of net charge of low density lipoproteins in high affinity binding and uptake by cultured cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 485 (1979)

67. Filipovic, I., Schwarzmann, G., Mraz, W., Wiegandt, H., Buddecke, E.: Sialic-acid content of low-density lipoproteins controls their binding and uptake by cultured cells. Eur. J. Biochem. 93, 51 (1979)

68. Fischer, G.M., Swain, M.L., Cherian, K.: Increased vascular collagen and elastin synthesis in experimental atherosclerosis in the rabbit. Atherosclerosis 35, 11 (1980)

69. Fisher-Dzoga, K., Jones, R.M., Vesselinovitch, D., Wissler, R.W.: Ultrastructural and immunohistochemical studies of primary cultures of aortic medial cells. Exp. Mol. Pathol. 18, 162 (1973)

70. Fisher-Dzoga, K., Chen, R., Wissler, R.W.: Effects of serum lipoproteins on the morphology, growth, and metabolism of arterial smooth muscle cells. In Advanc. Exp. Med. Biol. 43, 299 (1974), W.D. Wagner and T.B. Clarkson (eds.), Plenum Press, New York

71. Fisher-Dzoga, K., Wissler, R.W.: Stimulation of proliferation in stationary primary cultures of monkey aortic smooth muscle cells. Part 2. Effect of varying concentrations of hyperlipemic serum and low density lipoproteins of varying dietary fat origins. Atherosclerosis 24, 515 (1976)

72. Florén, C.-H., Albers, J.J., Biermann, E.L.: Uptake of chylomicron remnants causes cholesterol accumulation in cultured human arterial smooth muscle cells. Biochim. Biophys. Acta 663, 336 (1981)

73. Fogelman, A.M., Shechter, I., Seager, J., Hokom, M., Child, J.S., Edwards, P.A.: Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyt-macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2214 (1980)

74. Foidart, J., Dechenne, C., Mahieu, P., Muh, J.P., Bardos, P.: The biosynthesis of basement membrane collagen by mesangial cell lines derived from normal and diabetic (db/db) mouse glomeruli. In: Cellular and Biochemical Aspects in Diabetic Retinopathy, Inserm Syposium No 7, Regnault, F., Duhault, J. (eds.), 113 (1978), Elsevier/North-Holland Biomedical Press

75. Fontaine, M., Malmendier, C.L.: Relationship between the carbohydrate content of apoproteins of VLDL, IDL and LDL and the plasma level of these lipoproteins in man. Atherosclerosis 30, 285 (1978)

76. Fowler, S., Shio, H., Wolinsky, H.: Subcellular fractionation and morphology of calf aortic smooth muscle cells. J. Cell Biol. 75, 166 (1977)

77. Fowler, S., Kraus, J., Packman, S., Rosenberg, L.E.: Homocystinuria. Evidence for three distinct classes of cystathionine ß-synthase mutants in cultured fibroblasts. J. Clin. Invest. 61, 645 (1978)

78. Frey, P., Forand, R., Maciag, T., Shooter, E.M.: The biosynthetic precursor of epidermal growth factor and the mechanism of its processing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6294 (1979)

79. Fung, C.H., Khachadurian, A.K.; Suppression of synthesis and esterification of cholesterol and stimulation of low density lipoprotein receptor activity by polyoxyethylated cholesterol in cultured human fibroblasts. J. Biol. Chem. 255, 676 (1980)

80. Fushimi, H., Tarui, S.: Retina, tear and serum beta-N-acetylglucosaminidase activities in diabetic patients. Clin. Chim. Acta 71, 1 (1976)

81. Fuster, V., Bowie, E.J.W., Lewis, J.C., Fass, D.N., Owen, C.A., Brown, A.L.: Resistance to arteriosclerosis in pigs with von Willebrand's disease. Spontaneous and high cholesterol diet-induced arteriosclerosis. J. Clin. Invest. 61, 722 (1978)

82. Gabbiani, G., Schmid, E., Winter, St., Chaponnier, Ch.: Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle sells: Predominance of vimentin filaments and a specific a-type actin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 298 (1981)

83. Garcia, M.J., McNamara, P.M., Gordon, T., Kannel, W.B.: Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. Diabetes 23, 105 (1974)

84. Gelmann, B.B., Papa, L., Davis, M.H., Gruenstein, E.: Decreased lysosomal dipeptidyl aminopeptidase I activity in cultured human skin fibroblasts in Duchenne's muscular dystrophy. J. Clin. Invest. 65, 1398 (1980)

85. Gerrard, J.M., Phillips, D.R., Rao, G.H.R., Plow, E.F., Walz, D.A., Ross, R., Harker, L.A., White, J.G.: Biochemical studies of two patients with the gray platelet syndrome. Selective deficiency of platelet alpha granules. J. Clin. Invest. 66, 102 (1980)

86. Gimbrone, M.A., Cotran, R.S.: Human vascular smooth muscle in culture. Growth and ultrastructure. Lab. Invest. 33, 16 (1975)

87. Goldfine, I.D., Smith, G.J., Wong, K.Y., Jones, A.L.: Cellular uptake and nuclear binding of insulin in human cultured lymphocytes: Evidence for potential intracellular sites of insulin action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1368 (1977)

88. Goldfischer, S., Schiller, B., Wolinsky, H.: Lipid accumulation in smooth muscle cell lysosomes in primate atherosclerosis. Am. J. Pathol. 78, 497 (1975)

89. Goldstein, S.: Lifespan of cultured cells in progeria. Lancet 1, 424 (1969)

90. Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W., Brown, M.S.: Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. Nature 279, 679 (1979)

91. Goldstein, J.L., Basu, S.K., Brunschede, G.Y., Brown, M.S.: Release of low density lipoprotein from its cell surface receptor by sulfated glycosaminoglycans. Cell 7, 85 (1976)

92. Goldstein, J.L., Brown, M.S.: Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. J. Biol. Chem. 249, 5153 (1974)

93. Goldstein, J.L., Brown, M.S.: Atherosclerosis: The low-density lipoprotein receptor hypothesis. Metabolism 26, 1257 (1977)

94. Goldstein, J.L., Brown, M.S.: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. Ann. Rev. Biochem. 46, 897 (1977)

95. Goldstein, J.L., Dana, S.E., Faust, J.R., Beaudet, A.L., Brown, M.S.: Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. J. Biol. Chem. 250, 8487 (1975)

96. Goldstein, J.L., Faust, J.R., Dygos, J.H., Chorvat, R.J., Brown, M.S.: Inhibition of cholesteryl ester formation in human fibroblasts by an analogue of 7-ketocholesterol and by progesterone. Cell Biol. 75, 1877 (1978)

97. Goldstein, S., Littlefield, J.W., Soeldner, J.S.: Diabetes mellitus and aging: Diminished plating efficiency of cultured human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64, 155 (1969)

98. Goldstein, S., Moerman, E.J., Heat-labile enzymes in skin fibroblasts from subjects with progeria. N. Engl. J. Med. 292, 1305 (1975)

99. Goldstein, S., Moerman, E.J., Soeldner, J.S., Gleason, R.E., Barnett, D.M.: Diabetes mellitus and prediabetes: Decreased replicative capacity of cultured fibroblasts. J. Clin. Invest. 53, 27a (1971)

100. Goldstein, S., Moerman, E.J., Soeldner, J.S., Gleason, R.E., Barnett, D.M.: Chronologic and physiologic age affect replicative life-span of fibroblasts from diabetic, prediabetic, and normal donors. Science 199, 781 (1978)

101. Goldstein, S., Moerman, E.J., Soeldner, J.S., Gleason, R.E., Barnett, D.M.: Diabetes mellitus and genetic prediabetes. Decreased replicative capacity of cultured skin fibroblasts. J. Clin. Invest. 63, 358 (1979)

102. Goldstein, S., Niewiarowski, S., Singal, D.P.: Pathological implications of cell aging in vitro. Federation Proc. 34, 56 (1975)

103. Gonzalez-Angulo, A., Fraga, A., Mintz, G.: Submicroscopic alterations in capillaries of skeletal muscles in polymyositis. Am. J. Med. 45, 873 (1968)

104. Gordon, G.B., Barcza, M.A., Bush, M.E.: Lipid accumulation in hypoxic tissue culture cells. Am. J. Path. 88, 663 (1977)

105. Gries, F.A.: Die Bedeutung der Diabetestherapie für die Entwicklung diabetischer Komplikationen. Intern. Welt 12, 387 (1979)

106. Gries, F.A., Koschinsky, T., Berchthold, P.: Obesity, diabetes, and hyperlipoproteinemia. Atherosclerosis Reviews 4, 71 (1979)

107. Gries, F.A., Koschinsky, T., Bünting, C.E., Schwippert, B.: In vitro studies on growth and lipoprotein metabolism in arterial smooth muscle cells and fibroblasts of diabetics. International Congress Series No. 500, Diabetes 1979, W.K. Waldhäusl (edit.), 594 (1979), Elsevier/North-Holland, Excerpta Medica

108. Gwynne, J.T., Hess, B.: Binding and degradation of human $^{125}$I-HDL by rat adrenocortical cells. Metabolism 27, 1593 (1978)

109. Haley, N.J., Fowler, S., de Duve, C.: Lysosomal acid cholesteryl esterase activity in normal and lipid-laden aortic cells. J. Lipid Res. 21, 961 (1980)

110. Hall, P.F., Nakamura, M.: The influence of adrenocorticotropin on transport of a cholesteryl linoleate-low density lipoprotein complex into adrenal tumor cells. J. Biol. Chem. 254, 12547 (1979)

111. Hamilton, T.A., Wada, H.G., Sussman, H.H.: Identification of transferrin receptors on the surface of human cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6406 (1979)

112. Harker, L.A., Ross, R., Slichter, S.J., Scott, C.R.: Homocystine-induced arteriosclerosis. J. Clin. Invest. 58, 731 (1976)

113. Hasilik, A., Neufeld, E.F.: Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. J. Biol. Chem. 255, 4937 (1980)

114. Hauss, W.H.: Über die Rolle des Mesenchyms in der Genese der Arteriosklerose. Virchows Arch. Abt. A Path. Anat. 359, 135 (1973)

115. Hauss, W.H., Mey, J., Schulte, H.: Effect of risk factors and antirheumatic drugs on the proliferation of aortic wall cells. Atherosclerosis 34, 119 (1979)

116. Havel, R.J., Eder, J.A., Bragdon, J.H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J. Clin. Invest. 34, 1345 (1955)

117. Havel, R.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S.: Lipoproteins and lipid transport. In: Metabolic control and disease. Bondy, P.K., Rosenberg, L.E. (eds.), 393 (1980) Saunders Comp., Philadelphia, London, Toronto

118. Havekes, L., Vermeer, B.J., de Witt, E., Emeis, J.J., Vaandrager, H., van Gent, C.M., Koster, J.F.: Suppression of cholesterol synthesis in cultured fibroblasts from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia by her own low density lipoprotein density fraction. Biochim. Biophys. Acta 617, 529 (1980)

119. Hayashi, I., Sato, G.H.: Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. Nature 259, 132 (1976)

120. Hayflick, L.: Current theories of biological aging. Federation Proc. 34, 9 (1975)

121. Hayflick, L.: The cell biology of human aging. New Engl. J. Med. 295, 1302 (1976)

122. Heggeness, M.H., Wang, K., Singer, S.J.: Intracellular distributions of mechanochemical proteins in cultured fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3883 (1977)

123. Helderman, J.H., Raskin, P.: The T-lymphocyte insulin receptor in diabetes and obesity. An intrinsic binding defect. Diabetes 29, 551 (1980)

124. Heldin, C.-H., Westermark, B., Wasteson, A.: Platelet-derived growth factor: Purification and partial characterization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3722 (1979)

125. Henze, K., Chait, A.: Insulin treatment of diabetes enhances lysosomal enzyme activity and low density lipoprotein (LDL) degradation by circulating mononuclear cells (MC). Diabetes 29, (Suppl. 2) 11A (1980)

126. Henze, K., Chait, A.: Lysosomal enzyme activities and low density lipoprotein receptors in circulating mononuclear cells. Diabetologia 20, 625 (1981)

127. Hinegardner, R.: An improved fluorometric assay for DNA. Analyt. Biochem. 39, 197 (1971)

128. Hollenberg, M.D., Cuatrecasas, P.: Insulin: interaction with membrane receptors and relationship to cyclic purine nucleotides and cell growth. Federation Proc. 34, 1556 (1975)

129. Holley, R.W.: Control of growth of mammalian cells in cell culture. Nature 258, 487 (1975)

130. Holley, R.W., Armour, R., Baldwin, J.H.: Density-dependent regulation of growth of BSC-1 cell in cell culture: Control of growth by low molecular weight nutrients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 339 (1978)

131. Howard, B.V., Fields, R.M., Mott, D.M., Savage, P.J., Nagulesparan, M., Bennett, P.H.: Diabetes and cell growth - Lack of differences in growth characteristics of fibroblasts from diabetic and nondiabetic Pima Indians. Diabetes 29, 119 (1980)

132. Howard, B.V., Hidaka, H., Ishibashi, F., Fields, R.M., Bennet, P.H.: Type II diabetes and insulin resistance: Evidence for lack of inherent cellular defects in insulin sensitivity. Diabetes 30, 562 (1981)

133. Howard, B.V., Howard, W.J., Kefalides, N.A.: Regulation of lipid synthesis from acetate in diploid fibroblast cultures - variation with passage level and stage of cell growth. J. Cell Physiol. 89, 325 (1976)

134. Hutchings, S.E., Sato. G.H.: Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. Proc. Natl. Acad, Sci. USA 75, 901 (1978)

135. Jacobs, S., Cuatrecasas, P.: Cell receptors in disease. N. Engl. J. Med. 297, 1383 (1977)

136. Joyner, W.L., Mayhan, W.G., Johnson, R.L., Phares, C.K.: Microvascular alterations develop in syrian hamsters after the induction of diabetes mellitus by streptozotocin. Diabetes 30, 93 (1981)

137. Juretić, D., Lipovac, K., Hadzija, M., Slijepcevic, M.: The activities of glycosidases in diabetic rats. Diabetologia 15, 243 (1978)

138. Kern, P., Regnault, F.: Collagen type distributation in normal and diabetic mice skin. In: Cellular and Biochemical Aspects in Diabetic Retinopathy. Inserm Symposium No 7, Regnault, F., Duhault, J. (eds.), 141 (1978), Elsevier/ North-Holland, Biomedical Press

139. Kilo., C., Vogler, N.J., Williamson, J.R.: Muscle capillary basement membrane changes related to aging and to diabetes mellitus. Diabetes 21, 881 (1972)

140. Kim, H.J., Kurup, I.V.: Increased catabolism of glycosylated low density lipoprotein (g-LDL) by rat peritoneal macrophage. Diabetes 29, (Suppl. 2) 3A (1980)

141. King, G.L., Kahn, C.R.: Insulins from phylogenetically diverse species conserve growth promoting activity in human fibroblasts. Diabetes 29, (Suppl. 2 ) 14A (1980)

142. King, G.L., Kahn, C.R., Rechler, M.M., Nissley, S.P.: Direct demonstration of separate receptors for growth and metabolic activities of insulin and multiplication-stimulating activity (an insulinlike growth factor) using antibodies to the insulin receptor. J. Clin. Invest. 66, 130 (1980)

143. King, A.Ch., Hernaez-Davis, L., Cuatrecasas, P.: Lysosomotropic amines inhibit mitogenesis induced by growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 717 (1981)

144. Kohn, R.R., Hensse, S.: Abnormal collagen in cultures of fibroblasts form human beings with diabetes mellitus. Biochem. Biophys. Res. Comm. 76, 765 (1977)

145. Komolow, I.S., Fedotov, V.P.: Influence of insulin on mitotic rate in cultivated mammalian cells. Endocrinol. Exp. 12, 43 (1978)

146. Koschinsky, T., Bünting, C.E., Schwippert, B., Gries, F.A: Changes in lipoprotein metabolism and growth of fibroblasts from diabetic patients related to diabetic serum. Diabetologia 15, 247 (1978)

147. Koschinsky, T., Bünting, C.E., Schwippert, B., Gries, F.A.: Increased growth of human fibroblasts and arterial smooth muscle cells from diabetic patients related to diabetic serum factors and cell origin. Atherosclerosis 33, 245 (1979)

148. Koschinsky, T., Bünting, C.E., Schwippert, B., Gries, F.A.: Effect of diabetic serum on lipoprotein metabolism of fibroblasts and arterial smooth muscle cells. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 614 (1980)

149. Koschinsky, T., Carew, T.E., Steinberg, D.: A comparative study of surface binding of human low density and high density lipoproteins to human fibroblasts: regulation by sterols and susceptibility to proteolytic digestion. J. Lipid Res. 18, 451 (1977)

150. Koschinsky, T., Carew, T.E., Steinberg, D.: Regulation von Low (LDL)- und High (HDL) Density Lipoprotein-Bindungsorten an Fibroblasten von Stoffwechselgesunden und homozygoten familiären Hypercholesterinämikern (HFH). Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83, 378 (1977)

151. Koster, J.F., Vaandrager, H., van Berkel, T.J.C.: Study of the hydrolysis of 4-methylumbelliferyl oleate by acid lipase and cholesteryl oleate by acid cholesteryl esterase in human leucocytes, fibroblasts and liver. Biochim. Biophys. Acta 618, 98 (1980)

152. Kovanen, P.T., Nikkilä, E.A., Miettinen, T.A.: Regulation of cholesterol synthesis and storage in fat cells. J. Lipid Res. 16, 211 (1975)

153. Kruth, H.S., Vaughan, M.: Quantification of low density lipoprotein binding and cholesterol accumulation by single human fibroblasts using fluorescence microscopy. J. Lipid Res. 21, 123 (1980)

154. Kruth, H.S., Avigan, J., Gamble, W., Vaughan, M.: Effect of cell density on binding and uptake of low density lipoprotein by human fibroblasts. J. Cell Biol. 83, 588 (1979)

155. Laron, Z., Pertzelan, A., Mannheimer, S.: Genetic pituitary dwarfism with high serum concentrations of growth hormone: a new inborn error of metabolism. Isr. J. Med. Sci. 2, 152 (1966)

156. Laymann, D.L., Jelen, B.J., Illingworth, D.R.: Inability of serum from abetalipoproteinemic subjects to stimulate proliferation of human smooth muscle cells and dermal fibroblasts in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1511 (1980)

157. Ledet, T.: Growth hormone stimulating the growth of arterial medial cells in vitro. Absence of effect of insulin. Diabetes 25, 1011 (1976)

158. Ledet, T.: Growth hormone antiserum suppresses the growth effect of diabetic serum. Studies on rabbit aortic medial cell cultures. Diabetes 26, 798 (1977)

159. Ledet, T., Fisher-Dzoga, K., Wissler, R.W.: Growth of rabbit aortic smooth-muscle cells cultured in media containing diabetic and hyperlipemic serum. Diabetes 25, 207 (1976)

160. Lehmann, R., Dénes, R., Kerényi, T., Hauss, W.H.: Alteration of DNA template activity in artery wall cells induced by risk factors. In: State of prevention and therapy in human arteriosclerosis and in animal models. Abh. Rhein.-Westf. Akademie der Wissenschaften 63, 267, Westdeutscher Verlag, Opladen (1978)

161. Leroy, J.G., DeMars, R.I.: Mutant enzymatic and cytological phenotypes in cultured human fibroblasts. Science 157, 804 (1967)

162. Lie, S.O., Schofield, B.H., Taylor, H.A., Doty, S.B.: Structure and function of the lysosomes of human fibroblasts in culture: Dependence on medium pH. Pediat. Res. 7, 13 (1973)

163. Loeb, J.N.: Corticosteroids and growth. N. Engl. J. Med. 295, 547 (1976)

164. Lonchampt, M.O., Regnault, F.: Ultrastructure of normal and diabetic venous endothelium. In: Cellular and Biochemical Aspects in Diabetic Retinopathy, Inserm Symposium No 7, Renault, F., Duhault, J. (eds.), 31 (1978) Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

165. Louvard, D.: Apical membrane aminopeptidase appears at site of cell-cell contact in cultured kidney epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4132 (1980)

166. Lowry, O.M., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

167. Lucky, A.W., Mahoney, M.J., Barnett, R.J., Rosenberg, L.E.: Electron microscopy of human skin fibroblasts in situ during growth in culture. Exp. Cell Res. 92, 383 (1975)

168. MacFarlane, A.S.: Efficient trace-labeling of proteins with iodine. Nature (London) 182, 53 (1978)

169. Maciag, T., Cerundolo, J., Ilsley, S., Kelley, P.R., Forand, R.: An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: Identification and partial characterization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5674 (1979)

170. Mahley, R.W., Innerarity, T.L.: Interaction of canine and swine lipoproteins with low density lipoprotein receptor of fibroblasts as correlated with heparin/manganese precipitability. J. Biol. Chem. 252, 3980 (1977)

171. Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Bersot, T.P., Lipson, A., Margolis, S.: Alterations in human high-density lipoproteins, with or without increased plasma-cholesterol, induced by diets high in cholesterol. Lancet II, 807 (1978)

172. Mahley, R.W.: Cholesterol Feeding: Effects on lipoprotein structure and metabolism. In: Atherosclerosis V, 641 (1980) Gotto, A.M., Smith, L., Allen, B. (eds.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

173. Martin, G.M., Gartler, S.M., Epstein, C.J., Motulsky, A.G.: Diminished lifespan of cultured cells in Werner's syndrome. Federation Proc. 24, 678 (1965)

174. Martin, G.M., Olansky, L., Pohl, S.: Characterization of insulin resistance in cultured human skin fibroblasts. Diabetes 29 (Suppl. 2), 16A (1980)

175. Martin, G.M., Sprague, C.A., Norwood, T.H., Pendergrass, W.R.: Clonal selection, attenuation and differentiation in an in vitro model of hyperplasia. Am. J. Path. 74, 137 (1974)

176. Mello, R.J., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W.: LDL Receptors in coated vesicles isolated from bovine adrenal cortex: binding sites unmasked by detergent treatment. Cell 20, 829 (1980)

177. Merimee, T.J., Fitzgerald, C.R., Gold, L.A., McCourt, J.P.: Characteristics of growth hormone secretion in clinically stable diabetes. Diabetes 28, 308 (1979)

178. Merimee, T.J., Kennedy, A.L., Mehl, T.D., Rosenbloom, A.: Serum glycosidase activity in diabetes mellitus. Diabetes 30, 115 (1981)

179. Merz, G.S., Ross, J.D.: Viability of human diploid cells as a function of in vitro age. J. Cell. Physiol. 74, 219 (1969)

180. Miller, N.E.: Induction of low density lipoprotein receptor synthesis by high density lipoprotein in cultures of human skin fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta 529, 131 (1978)

181. Miller, L.R., Gordon, G.B., Bensch, K.G.: Cytological alterations in hereditary metabolic disorders. The effect of galactose on galactosemic fibroblasts in vitro. Lab. Invest. 19, 428 (1968)

182. Miller, N.E., Weinstein, D.B., Carew, T.E., Koschinsky, T., Steinberg, D.: Interaction between high density and low density lipoproteins during uptake and degradation by cultured human fibroblasts. J. Clin. Invest. 60, 78 (1977)

183. Miller, N.E., Weinstein, D.B., Steinberg, D.: Binding, internalization, and degradation of high density lipoprotein by cultured normal human fibroblasts. J. Lipid Res. 18, 438 (1977)

184. Miller, N.E., Yin, J.A.: Effects of cytochalasin B on low-density lipoprotein metabolism by cultured human fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta 530, 145 (1978)

185. Morell, B., Froesch, E.R.: Fibroblasts as an experimental tool in metabolic and hormone studies. II. Effects of insulin and nonsuppressible insulin-like activity (NSILA-S) on fibroblasts in culture. Europ. J. Clin. Invest. 3, 119 (1973)

186. Morrison, A.D., Orci, L., Perrelet, A., Winegrad, A.I.: Studies of the effects of an elevated glucose concentration on the ultrastructure and composite metabolism of the intact rabbit aortic intima-media preparation. Diabetes 28, 720 (1979)

187. Muggeo, M., Tiengo, A., Fedele, D., Crepaldi, G.: Growth hormone response to insulin and to arginine in patients with familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis 22, 543 (1975)

188. Myasnikov, A.L., Block, Y.E.: Influence of some factors on lipoidosis and cell proliferation in aorta tissue cultures of adult rabbits. J. Atheroscler. Res. 5, 33 (1965)

189. Myasnikov, A.L., Block, Y.E., Pavlov, V.M.: Influence of lipemic serum of patients with atherosclerosis on tissue cultures of adult human aortas. J. Atheroscler. Res. 6, 224 (1966)

190. Nakai, T., Otto, P.S., Whayne, T.F.: Proteolysis of canine apolipoprotein by acid proteases in canine liver lysosomes. Biochim. Biophys. Acta 422, 380 (1976)

191. Nicolson, G.L., Poste, G.: The cancer cell: Dynamic aspects and modifications in cell-surface organization. N. Engl. J. Med. 295, 197 (1976)

192. Obberghen van, E., De Meyts, P., Roth, J.: Cell surface receptors for insulin and human growth hormone. Effect of microtubule and microfilament modifiers. J. Biol. Chem. 251, 6844 (1976)

193. Olden, K., Pratt, R.M., Jaworksi, C., Yamada, K.M.: Evidence for role of glycoprotein carbohydrates in membrane transport: Specific inhibition by tunicamycin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 791 (1979)

194. Oseid, S., Beck-Nielsen, H., Pedersen, O., Søvik, O.: Decreased binding of insulin to its receptor in patients with congenital generalized lipodystrophy. N. Engl. J. Med. 296, 245 (1977)

195. Østerby, R., Gundersen, H.J.G.: Fast accumulation of basement membrane material and the rate of morphological changes in acute experimental diabetic glomerular hypertrophy. Diabetologia 18, 493 (1980)

196. Ostlund, R.E., Pfleger, B., Schonfeld, G.: Role of microtubles in low density lipoprotein processing by cultured cells. J. Clin. Invest. 63, 75 (1979)

197. Oxender, D.L., Lee, M., Cecchini, G.: Regulation of amino acid transport activity and growth rate of animal cells in culture. J. Biol. Chem. 252, 2680 (1977)

198. Parker, F., Odland, G.F.: A correlative histochemical, biochemical and electron microscopic study of experimental atherosclerosis in the rabbit aorta with special reference to the myo-intimal cell. Am. J. Pathol. 48, 197 (1966)

199. Parker, F., Odland, G.F.: Experimental xanthoma. A correlative biochemical, histologic, histochemical and electron microscopic study. Am. J. Pathol. 53, 537 (1968)

200. Patsch, W., Rindler-Ludwig, R., Sailer, S., Braunsteiner, H.: Acid cholesterol esterase and glycerol ester hydrolase activities. Evidence for the individuality of these enzymes in human mononuclear leucocytes. Biochim. Biophys. Acta 618, 337 (1980)

201. Patsch, W., Witztum, J.L., Ostlund, R., Schonfeld, G.: Structure, immunology, and cell reactivity of low density lipoprotein from umbilical vein of a newborn type II homozygote. J. Clin. Invest. 66, 123 (1980)

202. Paul, D., Niewiarowsky, S., Varma, K.G., Rucinski, B., Rucker, S., Lange, E.: Human platelet basic protein associated with antiheparin and mitogenic activities: Purification and partial characterization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5914 (1980)

203. Paul, J., Pearson, E.S.: The action of insulin on the metabolism of cell cultures. J. Endocrin. 21, 287 (1960)

204. Pearson, J.D.: Lipid metabolism in cultured aortic smooth muscle cells and comparison with other cell types. Part I. Composition of cells grown in hyperlipemic serum. Atherosclerosis 24, 233 (1976)

205. Pearson, J.D.: Lipid metabolism in cultured aortic smooth muscle cells and comparison with other cell types. Atherosclerosis 25, 205 (1976)

206. Peters, T.J., de Duve, C.: Lysosomes of the arterial wall. Part II: Subcellular fractionation of aortic cells isolated from rabbits with experimental atheroma. Exp. Mol. Pathol. 20, 228 (1974)

207. Phillips, L.S., Vassilopoulou-Sellin, R.: Somatomedins. N. Engl. J. Med. 302, 371 (1980)

208. Pietilä, K., Nikkari, T.: Enhanced growth of smooth muscle cells from atherosclerotic rabbit aortas in culture. Atherosclerosis 36, 241 (1980)

209. Pietilä, K., Nikkari, T.: Enhanced synthesis of collagen and total protein by smooth muscle cells from atherosclerotic rabbit aortas in culture. Atherosclerosis 37, 11 (1980)

210. Pinto da Silva, P., Gilula, N.B.: Gap junctions in normal and transformed fibroblasts in culture. Exp. Cell Res. 71, 393 (1972)

211. Pitas, R.E., Innerarity, T.L., Arnold, K.S., Mahley, R.W.: Rate and equilibrium constants for binding of apo-E $HDL_c$ (a cholesterol-induced lipoprotein) and low density lipoproteins to human fibroblasts: Evidence for multiple receptor binding of apo-E $HDL_c$. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2311 (1979)

212. Pitkänen, E., Kyllästinen, M., Koivula, T., Hormila, P.: ß-N-acetylglucosaminidase and ß-glucuronidase activities in insulin-dependent diabetic subjects with retinopathy. Diabetologia 18, 275 (1980)

213. Pittman, R.C., Williams, J.C., Miller, A.L., Steinberg, D.: Acid acylhydrolase deficiency in I-cell disease and pseudohurler polydystrophy. Biochim. Biophys. Acta 575, 399 (1979)

214. Raizada, M.K., Wu, W.B., Fellows, R.E.: Expression of insulin receptors in skin fibroblasts of diabetic (db/db) mice. J. Cell Biol. 79, 46a (1978)

215. Rechler, M.M., Podskalny, J.M.: Insulin receptors in cultured human fibroblasts. Diabetes 25, 250 (1976)

216. Reckless, J.P.D., Weinstein, D.B., Steinberg, D.: Lipoprotein and cholesterol metabolism in rabbit arterial endothelial cells in culture. Biochim. Biophys. Acta 529, 475 (1978)

217. Richmann, R., Claus, T.H., Pilkis, S.J., Friedman, D.L.: Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3589 (1976)

218. Riddle, M.C., Fujimoto, W., Ross, R.: Two cholesterol ester hydrolases. Distribution in rat tissue and in cultured human fibroblasts and monkey arterial smooth muscle cells. Biochim. Biophys. Acta 488, 359 (1977)

219. Rinderknecht, E., Humbel, R.E.: Polypeptides with non-suppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: Isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2365 (1976)

220. Rönnemaa, T., Doherty, N.S.: Effect of serum and liver extracts from hypercholesterolemic rats on the synthesis of collagen by isolated aortas and cultured aortic smooth muscle cells. Atherosclerosis 26, 261 (1977)

221. Röthig, H.-J., Stiller, N., Dahlmann, B., Reinauer, H.: Insulin effect on proteolytic activities in rat skeletal muscle. Horm. Metab. Res. 10, 101 (1978)

222. Rome, L.H., Garvin, A.J., Allietta, M.M., Neufeld, E.F.: Two species of lysosomal organelles in cultured human fibroblasts. Cell 17, 143 (1979)

223. Rosen, P., Misfeldt, D.S.: Cell density determines epithelial migration in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4760 (1980)

224. Rosenbloom, A.L., Goldstein, S., Yip, C.C.: Insulin binding to cultured human fibroblasts increases with normal and precocious aging. Science 193, 412 (1976)

225. Rosenbloom, A.L., Rosenbloom, E.K.: Insulin-dependent childhood diabetes. Normal viability of cultured fibroblasts. Diabetes 27, 338 (1978)

226. Ross, R., Benditt, E.P.: Wound healing and collagen formation. V. Quantitative electron microscope radioautographic observations of proline-$H^3$ utilization by fibroblasts. J. Cell Biol. 27, 83 (1965)

227. Ross, R.: The fibroblast and wound repair. Biol. Review 43, 51 (1968)

228. Ross, R.: The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle cells in cultures and formation of elastic fibers. J. Cell Biol. 50, 172 (1971)

229. Ross, R., Glomset, J.A.: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. Science 180, 1332 (1973)

230. Ross, R., Glomset, J.: Studies of primate arterial smooth muscle cells in relation to atherosclerosis. In: Advanc. Exp. Biol. Med. 43, 265 (1974), W.D. Wagner and T.B. Clarkson (eds.), Plenum Press, New York

231. Ross, R., Glomset, J.A.: The pathogenesis of atherosclerosis. N. Engl. J. Med. 295, 369 (1976)

232. Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., Raines, E., Bungenberg de Jong, J.: The cells of the artery wall in the study of atherosclerosis. In: International Cell Biology, 629 (1976-1977), B.R. Brinkley and K.R. Porter (eds.) Rockefeller University Press, New York

233. Ross, R., Vogel, A.: The platelet-derived growth factor. Cell 14, 203 (1978)

234. Roth, J.S., Losty, T., Wierbicki, E.: Assay of proteolytic enzyme activity using a $^{14}C$-labeled hemoglobin. Analyt. Biochem. 42, 214 (1971)

235. Rothblat, G.H., Arbogast, L.Y., Quellette, L., Howard, B.V.: Preparation of delipidized serum protein for use in cell culture systems. In Vitro 12, 554 (1976)

236. Rothman, J.E., Fine, R.E.: Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 780 (1980)

237. Rounds, D.E., Booher, J., Guerrero, R.R.: Consideration of atherosclerotic plaques as benign neoplasms. Atherosclerosis 25, 183 (1976)

238. Rowe, D.W., Starman, B.J., Fujimoto, W.Y., Williams, R.H.: Abnormalities in proliferation and protein synthesis in skin fibroblast cultures from patients with diabetes mellitus. Diabetes 26, 284 (1977)

239. Salomon, D.S., Liotta, L.A., Kidwell, W.R.: Differential response to growth factor by rat mammary epithelium plated on different collagen substrata in serum-free medium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 382 (1981)

240. Savion, N., Vlodavsky, I., Gospodarowicz, D.: Role of the degradation process in the mitogenic effect of epidermal growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1466 (1980)

241. Schilling, E.E., Rechler, M.M., Grunfeld, C., Rosenberg, A.M.: Primary defect of insulin receptors in skin fibroblasts cultured from an infant with leprechaunism and insulin resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5877 (1979)

242. Shakespeare, V., Postle, A.D.: Regulation of cholesterol synthesis in skin fibroblasts derived from old people. Atherosclerosis 33, 359 (1979)

243. Shinomiya, M., Matsuoka, N., Shirai, K., Saito, Y., Kumagai, A.: Studies on cholesterol esterase in rat arterial wall. Atherosclerosis 33, 343 (1979)

244. Shireman, R.B., Fisher, W.R.: Apolipoprotein B: its role in the control of fibroblast cholesterol biosynthesis and in the regulation of its own binding to cellular receptors. J. Lipid Res. 20, 594 (1979)

245. Silbert, C.K., Kleinman, H.K.: Studies of cultured human fibroblasts in diabetes mellitus. Changes in heparan sulfate. Diabetes 28, 61 (1979)

246. Simons, J.W.I.M.: The use of frequency distributions of cell diameters to characterize cell populations in tissue cultures. Exp. Cell Res. 45, 336 (1967)

247. Sirek, O.V., Sirek, A., Cukerman, E.: Arterial glycosaminoglycans in diabetic dogs. Diabetes 29, (Suppl. 2) 12A (1980)

248. Sloan, H.R., Fredrickson, D.S.: Enzyme deficiency in cholesteryl ester storage disease. J. Clin. Invest. 51, 1923 (1972)

249. Smith, E.B., Massie, I.B.: Is plasma lipoprotein destroyed by lysosomal Cathepsin in intima? Prog. Biochem. Pharmacol. 14, 253 (1977)

250. Smith, E.B., Silbert, C.K.: Fibronectin and collagen of cultured skin fibroblasts in diabetes mellitus. Biochem. Biophys. Res. Com. 100, 275 (1981)

251. Soll, A.H., Kahn, C.R., Neville, D.M., Roth, J.: Insulin receptor deficiency in genetic and acquired obesity. J. Clin. Invest. 56, 769 (1975)

252. Soltys, P.A., Portman, O.W.: Low density lipoprotein receptors and catabolism in primary cultures of rabbit hepatocytes. Biochim. Biophys. Acta 574, 505 (1979)

253. Spiro, R.G.: Search for a biochemical basis of diabetic microangiopathy. Diabetologia 12, 1 (1976)

254. Stahl, P., Schlesinger, P.H., Sigardson, E., Rodman, J.S., Lee, Y.C.: Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: Characterization and evidence of receptor recycling. Cell 19, 207 (1980)

255. St. Clair, R.W., Leight, M.A.: Differential effects of isolated lipoproteins from normal and hypercholesterolemic rhesus monkeys on cholesterol esterification and accumulation in arterial smooth muscle cells in culture. Biochim. Biophys. Acta 530, 279 (1978)

256. St. Clair, R.W., Mitschelen, J.J., Leight, M.: Metabolism by cells in culture of low-density lipoproteins of abnormal composition from non-human primates with diet-induced hypercholesterolemia. Biochim. Biophys. Acta 618, 63 (1980)

257. Stary, H.C.: Proliferation of arterial cells in atherosclerosis. In: Advanc. Exp. Med. Biol. 43, 59, W.D. Wagner and T.B. Clarkson (eds.) Plenum Press, New York (1974)

258. Stein, O., Vanderhoek, J., Stein, Y.: Cholesterol ester accumulation in cultured aortic smooth muscle cells. Atherosclerosis 26, 465 (1977)

259. Stein, O., Weinstein, D.B., Stein, Y., Steinberg, D.: Binding, internalization, and degradation of low density lipoprotein by normal human fibroblasts and by fibroblasts from a case of homozygous familial hypercholesterolemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 14 (1976)

260. Steinberg, D.: Lipoprotein metabolism - new insight from cell biology. In: Drugs, lipid metabolism, and atherosclerosis. 3 (1978), D. Kritchevsky, R. Paoletti, and W.L. Holmes (eds.) Plenum Publishing Corporation, New York

261. Steinberg, D., Carew, T.E., Weinstein, D.B., Koschinsky, T.: Binding, uptake, and catabolism of low density (LDL) and high density lipoproteins (HDL) by cultured smooth muscle cells. In: Lipoprotein Metabolism, 90 (1976), H. Greten (edit.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

262. Steinberg, D., Nestle, P.J., Weinstein, D.B., Remaut-Desmeth, M., Chang, S.M.: Interactions of native and modified human low density lipoproteins with human skin fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta 528, 199 (1978)

263. Stiles, G.D., Capone, G.T., Scher, C.D., Antoniades, H.N., van Wyk, J.J., Pledger, W.J.: Dual control of cell growth by somatomedins and plated-derived growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1279 (1979)

264. Stout, R.W.: The effect of insulin and glucose on sterol synthesis in cultured rat arterial smooth muscle cells. Atherosclerosis 27, 271 (1977)

265. Stout, R.W.: Relative insensitivity to glucagon of sterol synthesis in cultured rat aortic smooth muscle cells. Effect of dibutyryl cyclic AMP. Diabetologia 15, 323 (1978)

266. Stout, R.W.: Diabetes and atherosclerosis - The role of insulin. Diabetologia 16, 141 (1979)

267. Stout, R.W., Bierman, E.L., Ross, R.: Effect of insulin on the proliferation of cultured primate arterial smooth muscle cells. Circ. Res. 36, 319 (1975)

268. Sudhakaran, P.R., Prinz, R., Filipovic, I., von Figura, K., Buddecke, E.: Homologous low density lipoprotein does not affect proteoglycan metabolism of cultured skin fibroblasts and arterial smooth muscle cells. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 129 (1980)

269. Susa, J.B., McCormick, K.L., Widness, J.A., Singer, D.B., Oh, W., Admsons, K., Schwartz, R.: Chronic hyperinsulinemia in the fetal rhesus monkey. Effects on fetal growth and composition. Diabetes 28, 1058 (1979)

270. Tchobroutsky, G.: Relation of diabetic control to development of microvascular complications. Diabetologia 15, 143 (1978)

271. Tell, G.P., Haour, F., Saez, J.M.: Hormonal regulation of membrane receptors and cell responsiveness: A Review. Metabolism 27, 1566 (1978)

272. Teng, M.-H., Bartholomew, J.C., Bissell, M.J.: Insulin effect on the cell cycle: Analysis of the kinetics of growth parameters in confluent chick cells. Proc. Natl. Acad Sci. USA 73, 3173 (1976)

273. Thomas, W.A., Florentin, R.A., Reiner, J.M., Lee, W.M., Lee, K.J.: Alterations in population dynamics of arterial smooth muscle cells during atherogenesis. Exp. mol. Path. 24, 244 (1976)

274. Tilton, R.G., Hoffmann, P.L., Kilo, C., Williamson, J.R.: Pericyte necrosis and muscle capillary basement membrane (CBM) thickening in diabetes mellitus. Diabetes 29, (Suppl. 2) 3A (1980)

275. Tilton, R.G., Hoffmann, Ph.L., Kilo, Ch., Williamson, J.R.: Pericyte degeneration and basement membrane thickening in skeletal muscle capillaries of human diabetics. Diabetes 30, 326 (1981)

276. Traber, M.G., Kayden, H.J.: Low density lipoprotein receptor activity in human monocytederived macrophages and its relation to atheromatous lesions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5466 (1980)

277. Tulsiani, D.R.P., Buschiazzo, H.O., Tobert, B., Touster, O.: Changes in plasma hydrolase activities in hereditary and streptozotocin-induced diabetes. Arch. Biochem. Biophys. 181, 216 (1977)

278. Turner, J.L., Bierman, E.L.: Effects of glucose and sorbitol on proliferation of cultured human skin fibroblasts and arterial smooth-muscle cells. Diabetes 27, 583 (1978)

279. Umeda, F., Halle, J.P., Abarca, J., Leung, S., Franks, D.J., Hamet, P.: Effects of diabetic serum and platelets on growth of cultured vascular smooth muscle cells and fibroblasts. Diabetes 29, (Suppl. 2) 57A (1980)

280. Vermeer, B.J., Reman, R.C., Emeis, J.J., de Haas-van der Poel, C.A.C.: Immunoenzymehistochemical demonstration of the binding of low density lipoproteins to cultured human fibroblasts. Histochemistry 56, 197 (1978)

281. Villee, D.B., Powers, M.L.: Effect of glucose and insulin on collagen secretion by human skin fibroblasts in vitro. Nature 268, 156 (1977)

282. Vogel, A., Raines E., Kariya, B., Rivest, M.-J., Ross, R.: Coordinate control of 3T3 cell proliferation by platelet-derived growth factor and plasma components. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2810 (1978)

283. Vracko, R.: Basal lamina layering in diabetes mellitus. Evidence for accelerated rate of cell death and cell regeneration. Diabetes 23, 94 (1974)

284. Vracko, R.: Accumulation of basal lamina: A byproduct of cell renewal. In: Cellular and Biochemical Aspects in Diabetic Retinopathy, Inserm Symposium No. 7. F. Regnault, J. Duhault (eds.), 185 (1978), Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

285. Vracko, R., Benditt, E.P.: Restricted replicative lifespan of diabetic fibroblasts in vitro: its relation to microangiopathy. Federation Proc. 34, 68 (1975)

286. Wachsmuth, E.D., Fritze, I., Pfleiderer, G.: An amino-peptidase occuring in pig kidney. I. An improved method of preparation. Physical and enzymic properties. Biochemistry 5, 169 (1966)

287. Waheed, I., Poznanski, W.J.: Accelerated lipogenesis and adipose cell proliferation in culture as factor(s) in human obesity and maturity onset diabetes mellitus. Diabetes 29, (Suppl. 2) 62A (1980)

288. Weinstein, D.B., Carew, E.T., Steinberg, D.: Uptake and degradation of low density lipoprotein by swine arterial smooth muscle cells with inhibition of cholesterol biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 424, 404 (1976)

289. Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., Mahley, R.W.: Role of the lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. J. Biol. Chem. 253, 9053 (1978)

290. West, K.M. (edit.): Symposium on epidemiology of diabetes and its macrovascular complications. Diabetes Care 2, 63 (1979)

291. Williamson, J.R., Chang, K., Uitto, J., Rowald, E.A., Grant, G.A., Kilo, C.: Decreased collagen extractability in diabetes: Reversal by ß-aminopropionitrile (ßAPN) and D-penicillamine (D-pen). Diabetes 29, (Suppl. 2) 12A (1980)

292. Witte, L.D., Cornicelli, J.A.: Platelet-derived growth factor stimulates low density lipoprotein receptor activity in cultured human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5962 (1980)

293. Wolinsky, H.: A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. Circ. Res. 47, 301 (1980)

294. Wolinsky, H., Capron, L., Goldfischer, S., Capron, F., Coltoff-Schiller, B., Kasak, L.: Hydrolase activities in the rat aorta: II. Effects of hypertension alone and in combination with diabetes mellitus. Circ. Res. 42, 831 (1978)

295. Wolinsky, H., Goldfischer, S., Capron, L., Capron, F., Coltoff-Schiller, B., Kasak, L.: Hydrolase activities in the rat aorta: I. Effects of diabetes mellitus and insulin treatment. Circ. Res. 42, 821 (1978)

296. Wolman, M., Sterk, V.V., Gatt, S., Frenkel, M.: Primary familial xanthomatosis with involvement and calcification of the adrenals. Pediatrics 28, 742 (1961)

297. Zapf, J., Rinderknecht, E., Humbel, R.E., Froesch, E.R.: Nonsuppressible insulin-like activity (NSILA) from human serum: Recent accomplishments and their physiologic implications. Metabolism 27, 1803 (1978)

## 7. Schlußwort

Mein Dank gilt den Direktoren der Kliniken und Institute, an denen ich seit 1970 an Fragestellungen zu Problemen des Kohlenhydrat- und Lipoproteinstoffwechsels arbeiten durfte, Prof. Dr. K. Oberdisse, Prof. Dr. H.L. Krüskemper (2. Med. Klinik der Universität Düsseldorf), Prof. D. Steinberg (University of California, San Diego) und Prof. S. Grundy (Veterans Administration Hospital, San Diego).
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F.A. Gries (Diabetes-Forschungsinstitut an der Universität Düsseldorf) für die langjährige freundschaftliche Beratung und kritische Förderung bei der Planung und Durchführung meiner Arbeiten.

Für die engagierte Mitarbeit und Kooperation danke ich Frau Dipl. Biol. Bünting, Dr. Dahlmann (Düsseldorf), Prof. H. Canzler (Hannover), Dr. T. Carew, Prof. D. Weinstein (San Diego, Californien) sowie den Doktoranden L. Brix, I. Dieckmann und M. Caspari.

Die vorliegende Arbeit ist wesentlich durch die dankenswerte Unterstützung seitens der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Forschungsstipendium Ko 570/1 und die Mittelbewilligung für das Projekt F4 im SFB 113, Diabetologie, Düsseldorf), der Gesellschaft zur Förderung der Erforschung der Zuckerkrankheit e.V., Düsseldorf und der Paul Kuth Stiftung, Wuppertal ermöglicht worden.